

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
GENEETIKA ÕPPETOOL

**LapF-i ja taimemetaboliitide mõju *Pseudomonas putida*
biofilmile ja kasvule**

Bakalaureusetöö
12 EAP
Mia-Nicolena Aaver

Juhendaja PhD Riho Teras

TARTU 2020

Infoleht

LapF-i ja taimemetaboliitide mõju *Pseudomonas putida* biofilmile ja kasvule

Pseudomonas putida on taimede kasvu soodustav bakter, mis kinnitub taime juurtele ja moodustab seal biofilmi. *P. putida* tõrjub taimepatogeene ja aitab toitaineid pinnasest kätte saada. Biofilmi moodustamisel ja raku hüdrofoobsuse kujunemisel mängib rolli valk LapF.

Töös uurisin nelja taime kaitsemehhanismidega seotud kemikaali (naatriumsalitsülaadi, katehhooli, H₂O₂ ja *paraquat*'i) mõju *P. putida* kasvule ja biofilmi biomassile. Lisaks uurisin, kas LapF olemasolu parandab bakteri vastupanuvõimet kemikaalidele.

Selgus, et kõik neli kemikaali mõjutavad bakteri kasvu ja biofilmi. LapF-i puudumisel ja naatriumsalitsülaadi lisamisel oli bakteri biofilmi biomass väiksem ning generatsiooniaeg pikem. Teiste kemikaalide puhul LapF-l olulist mõju polnud.

Märksõnad: biofilm, *Pseudomonas putida*, LapF

CERCS kood ja nimetus: B220 – geneetika, tsütogeneetika

B230 – mikrobioloogia, bakterioloogia, viroloogia, mükoloogia

LapF and plant metabolites affect biofilm formation and growth of *Pseudomonas putida*

Pseudomonas putida is a plant growth-promoting rhizobacterium, which attaches to plant roots and forms a biofilm. *P. putida* repels plant pathogens, improves nutrient availability and can metabolize toxic compounds found in soil. LapF is a protein involved in biofilm formation and maintenance. Additionally, LapF increases cell hydrophobicity.

The aim of this work is to find a connection between plant metabolites (sodium salicylate, hydrogen peroxide, catechol and paraquat) and LapF. It was found that every used chemical influenced growth and biofilm formation in *P. putida* cells. LapF influenced the effect of sodium salicylate on *P. putida* cells – (hydrophobic) cells with LapF were more resistant to (hydrophilic) sodium salicylate.

Keywords: biofilm, *Pseudomonas putida*, LapF

CERCS code and designation: B220 – genetics, cytogenetics

B230 – microbiology, bacteriology, virology, mycology

Sisukord

Infoleht	2
Sisukord	3
Kasutatud lühendid	4
Sissejuhatus	5
1. Kirjanduse ülevaade	6
1.1. Kasulike risosfääribakterite tähtsus	6
1.1.1. Risosfäärne bakter <i>Pseudomonas putida</i>	7
1.2. Taimede risosfäär	9
1.3. Taime juureeritised ja uurimustöö seisukohalt olulised kemikaalid	10
1.4. Biofilm	11
1.4.1. <i>Pseudomonas putida</i> biofilm	13
1.5. <i>Pseudomonas putida</i> välispind	14
2. Uurimus	16
2.1. Töö eesmärgid	16
2.2. Materjal ja metoodika	16
2.2.1. <i>Pseudomonas putida</i> tüved ja kasvatamine	16
2.2.2. <i>P. putida</i> biofilmi biomassi mõõtmine	18
2.2.3. Statistiline analüüs	19
2.3. Tulemused	19
2.3.1. <i>P. putida</i> kasvu muutused kemikaalide mõjul	19
2.3.2. Biofilmi biomassi moodustamine	26
2.4. Arutelu	32
Kokkuvõte	35
Summary	36
Tänuõnad	37
Kasutatud kirjanduse loetelu	38
Kasutatud veebiaadressid	44
Lisad	45
Lisa 1. Na-Sal biofilmid. Neelduvuste (A_{540}) keskmised.	45
Lisa 3. Katehhooli biofilmid. Neelduvuste (A_{540}) keskmised.	47
Lisa 4. <i>Paraquat</i> 'i biofilmid. Neelduvuste (A_{540}) keskmised.	48

Kasutatud lühendid

c-di-GMP	(<i>cyclic di-guanosine monophosphate</i>) tsükliline di-guanosiin monofosfaat
EPS	(<i>exopolysaccharide</i>) eksopolüsahhariid
LPS	(<i>lipopolysaccharide</i>) lipopolüsahhariid
LTA	(<i>lipoteichoic acid</i>) lipoteihhuuhapped
NS	naatriumsalitsülaat/Na-salitsülaat
OD	(<i>optical density</i>) optiline tihedus
PGPR	(<i>plant-growth promoting rhizobacteria</i>) taime kasvu soodustavad risobakterid
QS	(<i>quorum sensing</i>) kvoorumitaju, hulgatunnetus
ROS	(<i>reactive oxygen species</i>) reaktiivne hapnikuühend
SA	(<i>salicylic acid</i>) salitsüülhape
WT	(<i>wild-type</i>) metsiktüüp, metsiktüvi

Sissejuhatus

Pseudomonas putida on risosfäärne bakter, mille taimejuurtele kinnitumine soodustab taimede kasvu, suurendab põllukultuuride saagikust, tõrjub eemale taimepatogeene, parandab taimede toitainete omastamist ja vähendab taimede haigestumist. Seetõttu on bakterit võimalik rakendada põllumajanduses, keskkonnatehnoloogias ja tööstuses. *P. putida*'t saab ohutult ning efektiivselt inimese huvides kasutada vaid juhul, kui on kogutud küllaldaselt informatsiooni bakteri füsioloogia ja interaktsioonide kohta teiste elusorganismidega, peamiselt taimedega. Samuti on taime-bakteri interaktsioon spetsiifiline ning *P. putida* kasutamine on tõhusam, kui on teada, kuidas bakter käitub taimede läheduses.

P. putida moodustab taimejuurtele kinnituses biofilmi – bakterikoosluse, kus rakud on paiksed. Biofilmi säilitamisel mängib väga tähtsat rolli pinnavalk LapF. Meie labori eelnevatest katsetest on järeldatud, et LapF mõjutab *P. putida* raku pinna hüdrofoobsust. Teades, et palju taimemetaboliite on hüdrofiilsed, oli töö eesmärgiks välja selgitada, kas LapF-i kui hüdrofoobsusfaktori olemasolul/puudumisel on mõju *P. putida* planktiliste rakkude generatsiooniajale ja biofilmi biomassile. Selleks kasutasin nelja kemikaali: Na-salitsülaati (NS), katehhooli, H₂O₂ ja *paraquat*'i. Võrdlesin metsiktüve planktiliste rakkude kasvu ja biofilmi biomassi moodustumist *P. putida* tüvedega, millel puudus *lapF* geen või oli *lapF*-i ekspressioon indutseeritav IPTG-ga.

Salitsüülhape on taime kaitsereaktsiooniga seotud signaalhormoon. Katehhool on fenooli derivaat, mis tekib bakteris salitsüülhappe lagundamisel ja võib tekitada oksüdatiivset stressi. Vesinikperoksiidil ja *paraquat*'il on sarnane mõju – mõlemad tekitavad oksüdatiivset stressi. Vesinikperoksiidi mõju on järsk ja kiire, *paraquat*'i abil saab tekitada pikaajalist, vähem intensiivset stressi.

See töö ei anna lõplikke vastuseid, vaid on pigem eeltöö edasiseks uurimustööks, et leida *P. putida* faktoreid, mis tagavad taimejuurte eduka koloniseerimise. Kui bakterit on põhjalikumalt uuritud, saaks seda kasutada põllumajanduses saagikuse tõstmiseks ja ka näiteks keskkonna puhastamiseks, nii eraldi kui sümbioosis taimedega.

1. Kirjanduse ülevaade

1.1. Kasulike risosfääribakterite tähtsus

Toiduks tarvitavate taimede saagikus on terves maailmas langemas. Kliimamuutuse, sademete hulga vähenemise, erosiooni, kõrbete pindala suurenemise tõttu jpt põhjustel väheneb nii söögi- ja söödataimede kasvatamiseks kõlbulik põllumaa kui ka põllukultuuride saagikus. Kui ei toimu muutust toidu (ja kõige muu) tarbimises, on vaja saagikust teiste vahendite abil tõsta, et vältida ülemaailmset näljahäda (Ray jt., 2013; Rizvi jt., 2018; Schiferl ja Heald, 2018).

Pikaaegne anorgaaniliste väetiste ning pestitsiidide kasutamine mõjutab pinnast – sinna kogunevad toksilised metallid, mis mõjutavad taimi. Lisaks muudavad pinnasesse kuhjuvad pestitsiidid ja lisaained pinnase mikrobiomi. Mikroobide mitmekesisus ja biomass pinnases on tähtsad näitajad, mille kaudu saab hinnata pinnase kvaliteeti. Mikroobide hulk pinnases varieerub vastavalt pinnase tüübile. Liivasavimuld on üsna viljakas mullatüüp, Hoyle jt andmetel on liivasavimulla mikroobide biomass keskmiselt 90 t C/ha (Hoyle jt., 2013). 5 µg pestitsiidi lisamine 1 g pinnase kohta vähendab biomassi 40%, kuid pinnases olev biomass taastub 8 päeva jooksul. 50 µg pestitsiidi lisamine 1 g pinnase kohta põhjustab pikaaegseid tagajärgi – mikroobide biomass väheneb permanentselt (Chowdhury jt., 2008; Guo jt., 2020).

Pestitsiidide ja väetiste asemel saab põllumajanduses kasutada kasulikke risobaktereid (PGPR - *plant growth-promoting rhizobacteria*). Risobakterid aitavad taimedel paremini toitaineid kätte saada. Näiteks muudavad risobakterid fosforiühendeid lihtsamalt lahustuvaks ning toodavad lämmastikuühendeid, mida taim suudab omastada. Lisaks lagundavad risobakterid saasteaineid, vähendades sel moel pinnases sisalduvate toksiliste ainete kontsentratsiooni. Risobakterid toodavad taimehormoone, ergutades taime kasvu ja tõrjuvad eemale patogeene. Mõlema protsessi tähtis osa on juure koloniseerimine (Aeron jt., 2019; Bhattacharyya ja Jha, 2012; Morgan jt., 2005).

Risobakteridid moodustavad taimedega sümbioosi ning aitavad taime mitmel moel. Neid bakterid saab jaotada kolme gruppi (Droge jt., 2012):

1. kasvu otseselt soodustavad risobakterid – toodavad fütohormoone või toitaineid (nt *P. putida*) (Egamberdieva ja Kucharova, 2009);
2. mükoriisa ja juuremügarate tekkeprotsessil osalevad risobakterid – mõjuvad positiivselt taime-bakteri interaktsioonidele (*Mesorhizobium loti*) (Desbrosses ja Stougaard, 2011);

3. biotõrje risobakterid (*biocontrol rhizobacteria*) – kaitsevad taime patogeenide eest antimikroobse ühendi tootmisega või taime immuunsuse ergutamisega (*B. subtilis* BMB26) (Pathak jt., 2017).

Risobakterite ekstratsellulaarne maatriks sisaldab eksopolüsahhariide (EPS – *exopolysaccharide*). EPS-e toodetakse põua ajal rohkem, kuna risobakteridon veepuuduse tõttu stressis. Katsetega on kirjeldatud, et risobakterite toodetud EPSid aitavad taimedel veepuudusega hakkama saada, eriti põuatingimustes. Näiteks *P. putida* tüvi GAP-P45 moodustab EPSi abil päevalille juurtele biofilmi ning kaitseb sedasi taime kuivamise eest (Naseem jt., 2018).

Risobakterid parandavad ümbritseva pinnase toitainete sisaldust ja kättesaadavust. Lämmastiku, mis on vajalik kõikide organismide kasvuks, fikseerimine on risosfääri bakterite üks tähtsamaid funktsioone (Aeron jt., 2019; Ren jt., 2020). Kuigi pinnases on enamasti fosforit hulgaliselt, ei ole see tihti taimedele kättesaadavas vormis. Risobakterid lahustavad fosfori, mis muutub taimele omastatavaks (Aeron jt., 2019).

Risobakterite mõjul muutub taime ehitus. Kasulikud risobakterid suurendavad juure pindala, mõjutavad rakkude ja isegi varte ehitust. *Bacillus pumilus* suurendab ligniini hulka ameerika hiidhirsi (*Pennisetum americanum*) epiteelkoos. *P. fluorescens* 63-28R ja *P. putida* (tüvi uurimuses täpsustamata) põhjustavad ligniini kogunemist hernetaimede juurtes ning lisaks inhibeerivad taime koloniseerimist tõusmepõletiku tekitajaga (*Pythium ultimum*). Ligniini kogunemine taimejuurtes mõjutab juurte pikkuskasvu. (Vacheron jt., 2013).

1.1.1. Risosfäärne bakter *Pseudomonas putida*

Perekonna *Pseudomonas* liigid on elukeskkonna suhtes paindlikud, võimelised kasutama palju C- ja energiaallikaid ning seetõttu saavad muutlikes tingimustes hakkama. Palju liike perekonnast *Pseudomonas* soodustab taimede kasvu, ent leidub ka taimedele patogeenseid tüvesid ja liike. Näiteks maisi juurte ümbrusest eraldatud *Pseudomonas* sp. PS01 mõjub nii maisi (*Zea mays*) kui müürlooga (*Arabidopsis thaliana*) kasvule positiivselt (Jin jt., 2019; Morgan jt., 2005).

P. putida-t leidub taimede lehtedel, juurtel ja ka üksikuna pinnases, kus bakter taimega interaktsioonis ei ole. See bakter võib taimede kasvu soodustada järgnevalt:

1. toodab taime kasvu soodustavaid fütohormoone;
2. hoiab eemal patogeene;
3. lagundab ümbruses leiduvad saasteaineid, nt fenoolseid ühendeid;
4. teeb kahjutuks reaktiivseid hapnikuühendeid.

P. putida toodab fütohormoone (nt IAA) ning nende prekursoreid (Vives-Peris jt., 2018). Siderofooride abil soodustab *P. putida* raua lahustumist ning seega ka taimel raua omastamist (Bar-Ness jt., 1991). Bakter suudab kinnituda ka seemnetele. Nii saaks Risobaktereid kasutada põllumajanduses – seemned saab kasta bakterikultuuriga, mis seemnete pinnale kinnitub ja siis peale istutamist taime koloniseerib. (Danhorn ja Fuqua, 2007).

P. putida tüved suudavad lagundada mitmesuguseid toksilisi kemikaale. Bakteril on võime süsinikuallikana kasutada mitmeid ohtlikke, sageli aromaatsed orgaanilisi ühendeid (nt fenooli, naftaleeni, tolueeni jne). Aromaatsed ühendid lõigatakse mitme etapi kaupa väiksemateks metaboliitideks, sageli on lagundamise üheks vaheproduktiks katehhool. Pinnase puhastamisel on eriti efektiivne taime-bakteri sümbioos. Näiteks mais ja TOL-plasmiidiga *P. putida* suudavad veest fenooli eemaldada kiiremini ja suuremas koguses, kui plasmiidita bakter või taim üksi (Jin jt., 2019; Kivisaar, 2020).

P. putida aitab taimel hakkama nt liiga soolases (*Citrus aurantiifolia* hapu laimipuu) või liiga kuumas (*Triticum aestivum* harilik nisu) keskkonnas. Kui hapu laimipuu (*Citrus aurantiifolia*) juuri on koloniseerinud *P. putida*, siis taim on vähem stressis ning saab kehvast keskkonnast paremini hakkama. Taim koguneb vähem proliini ja samas toodab taim kokku rohkem biomassi, sh tärklisi, aminohappeid, valke ja klorofüllit. Nisu (*Triticum aestivum*) talub paremini kuumust, kui taime on koloniseerinud *P. putida* – taim kasvab ebasobivalt kuumas temperatuuri juures kõrgemaks, toodab rohkem biomassi ja ajab ka juured sügavamale pinnasesse. Taim saab paremini keskkonnatingimustega hakkama tänu risobaktereid toodetud kasvuregulaatoritele. (Vives-Peris jt., 2018; Zulfikar Ali jt., 2011). Juurtele kinnitunud *P. putida* mõjutab taime ja põhjustab kaitsega seotud signaaliradade aktiveerumise. Kui *Arabidopsis thaliana* juurtele on kinnitunud *P. putida* BP25, toodab taim rohkem salitsüülhapet, mida taim kasutab nn kaasasündinud immuunsuse signaalmolekuliks. Lisaks toimub *P. putida*'ga inokuleerimisel juurte hargnemine, taimejuured on lühemad, ent rohkem pinna lähedal hargnenud (Sheoran jt., 2016; Yan ja Dong, 2014).

P. putida kaitseb taime mitmesuguste patogeenide eest. Kui inokuleerida punapeet (*Beta vulgaris*) *P. putida*'ga ja patogeenidega (tüved uurimuses täpsustamata), suudab taim

paremini patogeene tõrjuda. See kehtib mitme erineva patogeeni tüübi puhul – *P. putida* mõjus positiivselt nii ümarussi (*Meloidogyne incognita*), hallitusseene (*Rhizoctonia solani*) kui patogeense bakteriga (*Pectobacterium betavascularum*) nakatamisel (Khan ja Siddiqui, 2019).

Taimemetaboliidid mõjutavad tugevalt *P. putida*'t ja bakteri biofilmi moodustumist. Taimed eritavad suurel hulgal H_2O_2 , kui patogeenid ründavad taimi. Vesinikperoksiidi hulga järsk tõus tapab taimeraku, kuid sellega sureb ka patogeen. *P. putida* MnB1 (mangaani oksüdeeriv tüvi) lagundab efektiivselt söötmes leiduvat H_2O_2 ja väldib nii oksüdatiivset stressi. Sellel tüvel toimub 6 h hiljem, H_2O_2 lagundamise järel, intensiivne biofilmi moodustumine, 12 h hiljem on biofilm juba lagunenu (Zheng jt., 2018).

Katehhool on mürgine fenoolne ühend, mida leidub tööstuslikes jäätmetes. *P. putida* MTCC 1194 on võimeline lagundama nii fenooli kui katehhooli kõrgete kontsentratsioonide juures (katehhooli kuni 500 mg/l vees, fenooli kuni 1000 mg/l). (Kumar jt., 2005).

Paraquat on aine, mis tekitab pikaaegset oksüdatiivset stressi. Tegemist on toidutaimede kasvatamisel ühe levinuma herbitsiidiga. Aine pole biolagunev ning veepuhastusjaamades on vaja spetsiifilist metoodikat, et seda veest eraldada. Kui lisada *P. putida* bioreaktorisse, on võimalik töödeldavast veest lagundada 99% *paraquat*'ist (Kopytko jt., 2002).

1.2. Taimede risosfäär

Taimejuurte ja bakterite sümbioos on analoogne loomade ja nende seedetraktis leiduvate soolestikubakterite sümbioosiga. Mikroorganismid mõjutavad peremeesorganismi võimet omandada toitaineid. Sümbioosi tõttu muutub isegi peremehe fenotüüp – gnotobiondist roti soolestiku morfoloogia on teistsugune, lümfisõlmed on väiksemad, verd on kehas vähem. Vastavalt juure pinna koloniseerinud sümbiontidele muutub ka taimejuurte ehitus, näiteks on risobakteritega kaetud juurte pindala suurem. Taimejuurte pinda ning neid ümbritsevat ala, mida bakterid koloniseerivad, nimetatakse risosfääriks (Carter jt., 2020; Vacheron jt., 2013).

Täpsemalt hõlmab risosfäär taimejuurte pinda, juurestiku ümbruses paiknevat pinnast ja sealseid mikroorganisme. Risosfääris kasvavad bakterid reageerivad juurte eristele ning seal sisalduvatele metaboliitidele. Taime-bakteri mõju on vastastikune – mikroorganismi elutegevuse käigus tekkivad ühendid mõjutavad ka taimet (Morgan jt., 2005; Walker jt., 2003).

1.3. Taime juureeritised ja uurimustöö seisukohalt olulised kemikaalid

Juureeritiste hulgas on reaktiivsed hapnikuühendid (ROS - *reactive oxygen species*), ensüümid, madala molekulaarmassiga orgaanilised ühendid nagu süsivesikud, aminohapped, orgaanilised happed, rasvhapped ja mitmed muud metaboliidid. Taim eritab juurte kaudu aineid vastavalt vajadusele ning sellest johtuvat võib eritised jagada kahte rühma: jääkained ning kindla funktsiooniga ained, näiteks taime kaitsvad ühendid. Samuti saab juureeritisi jaotada molekulmassi järgi madala molekulmassiga aineteks (aminohapped, mono- või disahhariidid, aromaatsed tsüklilised ühendid) ja kõrge molekulmassiga aineteks (valgud ja polüsahhariidid). (Bais jt., 2006; Morgan jt., 2005).

Taimejuurte eritised on toiduks risosfääri mikroorganismidele. Taim eritab rohkem primaarseid metaboliite (süsinikuühendid, aminohapped, orgaanilised happed), kui sekundaarseid metaboliite (flavonoidid, aukiinid jne). Primaarsed metaboliidid, eriti süsinikuühendid ja aminohapped on toiduks risosfääri bakteritele. Sekundaarsete metaboliitide abil saab taim risosfääris leiduvaid mikroorganisme mõjutada, näiteks soodustada risobakterite kasvu ja rünnata patogeene. (Morgan jt., 2005; Vives-Peris jt., 2020).

Juureeritiste hulk väheneb taime vananemise, põua ja toitainete vaeguse mõjul. Eritiste koostis muutub taimede kasvades ja vananedes ning lisaks varieerub ka juurepiirkonniti. Noorte taimede puhul väljub juureeritistena kuni 30% taime assimileeritud süsinikust, idandite puhul isegi kuni 40%, mis võimaldab noorel taimel kasulikke risosfäärseid baktereid ligi meelitada. Eritiste koostisest on leitud peaaegu kõiki taime toodetud ühendeid, erandiks on klorofüll ja teised fotosünteesiga seotud ühendid. (Bais jt., 2006; Vives-Peris jt., 2020).

Risobakterite ligimeelitamine oleneb taimeliigist, taimed eelistavad neile sobivaid baktereid. Näiteks hariliku nisu (*Triticum aestivum*) eritatud D-fruktoos ja L-aspartaat on *Azospirillum brasilense* T60 jaoks atraktant. Samas, *Azospirillum lipoferum* ER15'1 need ühendid kemotaksist esile ei kutsu, bakter eelistab *Leptochloa fusca* juureeritisi, näiteks L-malaati. Bakterid kohanevad eelistatud peremeestaime metabolismiga – kui *A. lipoferum* eelistab C4 taimede (*Leptochloa fusca*) toodetud ühendeid, meelitavad bakterit *A. brasilense* ligi C3 (*Triticum aestivum*) metabolismi produktid (Drogue jt., 2012).

Salitsüülhape on taime kaasasündinud immuunsuse osa. SA on seotud nii patogeenide tõrjumise kui abiootilise stressivastusega, kloroplasti struktuuri reguleerimisega ja õitsemisega. Ühend on tähtis patogeeni tõrjumisel tekkiva oksüdatiivse stressi talumisel. Abiootilised stressorid, mille puhul SA on tähtis signaalmolekul, on näiteks põud, raskemetallide talumine, kuumus ja osmootse rõhu kõikumine. (Fariduddin jt., 2003; Rivas-San Vicente ja Plasencia, 2011; Yan ja Dong, 2014).

Salitsüülhape mängib rolli ka risobakterite äratundmisel. *A. thaliana nahG* mutant toodab salitsüülhappe lagundamisel katehhooli ning *Bacillus subtilis* FB17 ei suuda mutantse taime juurtele normaalselt biofilmi moodustada, samas bakteri planktiliste rakkude kasv pole mõjutatud. Ilmselt on biofilmi moodustamise pärssimine seotud ROSidega – katehhooli eritamine taimest põhjustab ROSide tekke (Rudrappa jt., 2007).

Katehhoool on paljudele bakteritele toksiline – *in vitro* katsetes 0,2 mM katehhooli lisamine 0 põhjustas *B. subtilis* FB17 biofilmi lagunemise (Rudrappa, Quinn, jt., 2007). Samas leidub ka baktereid, mis suudavad katehhooli lagundada – näiteks *P. putida* MTCC 1194 lagundab söötimest nii katehhooli kui fenooli. Siiski mõjuvad ühendid bakterile veidi kahjulikult – nende lisamisel bakteri lag-faas pikeneb (Kumar jt., 2005).

H₂O₂ on üks kemikaalidest, mida taim eritab ROS-purske ajal (reaktsioon, mis toimub osana taime immuunsüsteemist). H₂O₂ ja teiste ROSide eritamine toimub immuunvastusena kahes faasis – algul lühem faas, mille jooksul baktereid veel ei surmata. Sellele järgneb patogeeni äratundmisel pikem faas, mille mõjul eritatakse suurem hulk ROSe ning nii patogeeni kui taimerakk hukuvad. Kasulike bakterite või selliste patogeenide puhul, mida taim ära ei tunne, teist pikemat ROSide eritamise faasi ei toimu (Torres jt., 2006).

Paraquat on levinud herbitsiid, bioloogiaga seotud teadusuuringutes on ühendil aga teistsugune kasutusala. Selle abil saab tekitada pikaajalist oksüdatiivset stressi taimedes või bakterites ja uurida ROSide mõju (Lascano jt., 2012).

1.4. Biofilm

Enamik baktereid moodustab looduslikes tingimustes biofilmi – struktureeritud koosluse, milles koos eksisteerivad bakterirakke ühendab rakuväline maatriks. Biofilm on bakteritele kasulik mitmel moel – see kaitseb baktereid kahjulike keskkonnamõjude eest, võimaldab

vähema veega hakkama saada, kaitseb kiskjate eest ning soodustab toitainete kättesaadavust (López-Sánchez jt., 2016; Stanley ja Lazazzera, 2004).

Biofilm võib üksikrakule kahjulik olla. Kuna tegemist on tiheda struktureeritud bakterikogumiga, on toitainete kättesaadavus biofilmi süvakihis halvem ning jääkainetest vabanemine raskem. Seetõttu võib raku lähedusse kuhjuda rohkem jääkaineid, mis omakorda pärsib bakterirakkude kasvu (Gjermansen, Nilsson, Yang, ja Tolker-Nielsen, 2010).

Bakterirakud biofilmis on sessiilsed rakud, vabalt ujuvad (mitte biofilmi moodustunud) rakud on planktilised rakud. Looduses vahelduvad need kaks faasi vastavalt ümbritsevale keskkonnale. Üldiselt on sessiilsete ja planktiliste rakkude füsioloogia erinev, ent leidub ka sarnasusi. *Pseudomonas aeruginosa* varajase biofilmi rakkudes leiduvad valgud on sarnasemad eksponentsiaalses kasvufaasis planktilistele rakkudele (võrreldes statsionaarses faasis planktiliste rakkudega) (Berlanga ja Guerrero, 2016; Mikkelsen jt., 2007).

Kuigi kaks raku eluvormi pole täiesti võrreldavad, käituvad rakud mõnes situatsioonis siiski ühtemoodi. *P. aeruginosa* biofilmil ja planktilistel rakkudel on mõnele antimikroobsetele ühenditele sarnane tundlikkus, näiteks ofloksatsiin mõjub väga tugevalt nii biofilmi rakkudele kui planktilisele rakkudele (Spoering ja Lewis, 2001).

Taimede kasvu soodustavate bakterite kinnitumine juurele ja biofilmi moodustamine toimub 3 etapis (Drogue jt., 2012; Stanley ja Lazazzera, 2004):

1. adhesioon – kinnitumine pinnale, antud juhul taimejuurele risosfääris;
2. koloniseerimine – algul mikrokolooniate tekkimine, siis kolooniaid ühendavate rakuväliste struktuuride teke ning mikrokolooniate arenemine küpseks biofilmiks;
3. sümbioos – toimiv biofilm, mis on taimejuurtele seondunud ning mille metabolism mõjutab taime ja vastupidi.

Biofilmi teket mõjutavad paljud bakteri metabolismiga seotud faktorid, ent ka ümbritsevas keskkonnas leiduvad ühendid (nt taimemetaboliidid). Erinevate bakteriliikide biofilmi tekkemehhanismidel on ühiseid jooni – näiteks hulgatunnetus (*quorum sensing* e QS) ning toitainete kättesaadavus mõjutavad küpse biofilmi teket (Danhorn ja Fuqua, 2007).

Biofilmi tekkimist mõjutavad ümbritsevas keskkonnas esinevad ühendid. Põhiliselt mõjutavad biofilmi moodustumist süsinikuühendid, mida leidub taimede juureeritistes. Risosfääribaktereid mõjutavad ka nt paljud aminohapped (arginiin, ornitiin, isoleutsiin, leutsiin jne), millest arginiin surub tugevalt alla *P. putida* voogamist üle tahkete pindade.

Võimalik, et aminohapete kontsentratsioon pinnases mõjutab omakorda c-di-GMP kontsentratsiooni bakterirakus, millel omakorda on mõju liikuvusele ning biofilmi moodustumisele (Bernier jt., 2011).

Taimed toodavad palju tsüklilisi ühendeid (polüfenoolid, fenoolhapped, flavonoidid jne), millel on sageli mikroorganismide kasvu inhibeeriv mõju. *P. aeruginosa* PAO1 moodustab rohkem biofilmi kindlate tsükliliste ühendite mõjul – nõrgalt kasvu inhibeerivad kontsentratsioonid mõjuvad biofilmi moodustamisele positiivselt (Plyuta jt., 2013).

Salitsüülhappe mõju biofilmile pole täpselt teada, uurimuste tulemused on vastukäivad. Näiteks SA mõjub *P. aeruginosa* biofilmile vahel inhibeerivalt, vahel soodustavalt. SA akumulatsioonil *A. thaliana* mutantidel moodustab *P. aeruginosa* PA14 vähem biofilmi (võrreldes SA-puudulike mutantide või WT-taimega) (Prithiviraj jt., 2005). Samas, *in vitro* soodustab *P. aeruginosa* PAO1 SA biofilmi tekkimist kuni kontsentratsioonini 100 µg/ml (0,724 mM) (Plyuta jt., 2013). Põhjus võib olla nii erinevate tüvede kasutamine kui meetodika erinevus – *in vitro* saab SA kontsentratsiooni kontrollida, *in vivo* on happe kontsentratsioon aga kogu aeg küllalt kõrge, et biofilmi tekkimist inhibeerida.

1.4.1. *Pseudomonas putida* biofilm

P. putida biofilm on valgurikas. *P. putida* biofilmi maatriksis on tähtsad kaks pinnavalku: LapA ja LapF. LapA on bakteri biofilmi initsiatsiooniks ja kooshoidmiseks võtmetähtsusega. LapF on oluline pigem küpses biofilmis rakk-rakk interaktsioonide moodustamiseks (Martínez-Gil jt., 2010). Kui *lapA* geen deleteerida, siis *P. putida* biofilmi biomass väheneb nii täissöötmel LB kui ka defineeritud söötmel M9 (Moor, 2013). LapF-i roll biofilmi moodustamisel ja hoidmisel on veel küsitav. Näiteks on kirjeldatud, et LapF-i puudumine on oluline defineeritud söötmes M9, kuid mitte LB-s (Martínez-Gil jt., 2010).

P. putida pinnavalk LapF on küpse biofilmi valk ning mõjutab taimejuurte koloniseerimist. Varajane biofilm ja kinnitumine ei ole LapF-ist oluliselt mõjutatud, valk mängib rolli pikaaegsel biofilmi hoidmisel. *P. putida lapF*-mutant ei suuda defineeritud söötmes M9 moodustada normaalset struktureeritud biofilmi. LapF-vastased antikehad suruvad samuti biofilmi loomist alla (Martínez-Gil jt., 2010).

Geeni *lapF* transkriptsioon on sõltuv sigmafaktorist RpoS, mis on rohkelt statsionaarses faasis ning stressisituatsioonides. Risosfääris eritavad taimejuured küll toitaineid, ent põhjustavad ka

stressi koloniseerivates bakterites. Selle mõjul transkribeeritakse risosfääris *rpoS* geeni rohkem võrreldes eksponentsiaalses kasvufaasis või rakkudega, mis ei kasva taimedega samas keskkonnas (Martínez-Gil jt., 2010).

Fis on globaalne regulaator, mis mõjutab biofilmi teket *lapA* ja *lapF* geenide kaudu. *P. putida* *fis*-i üleekspresseeriv tüvi toodab rohkem biofilmi, kui metsiktüvi (Moor jt., 2014). Fis-i mõju oleneb aga söötmest. *P. putida* *fis*-i üleekspresseeriv tüvi F15 moodustab biofilmi LB-s paremini, M9 glc CAA söötmel moodustub biofilmi aga vähem ja Fis-i positiivset efekti biofilmi biomassile ei esine. Biofilmi moodustamine ei sõltu ilmingimata toitainete hulgast, aga on mõjutatud söötmete komponentidest (Puhm, 2018).

Sööde mõjutab ka *P. putida* *lapF*-deletandi biofilmi moodustumist. M9 glc CAA söötmes on *lapF* olemasolu hädavajalik normaalse biomassiga biofilmi moodustamiseks. Toitainerikkal LB söötmel moodustab *lapF*-deletant biofilmi normaalselt (Lahesaare, 2011).

1.5. *Pseudomonas putida* välispind

Bakterite välispinna ehitus on esimene barjäär bakteri ja väliskeskkonna vahel. Välismembraani muutmisega saab bakter tõrjuda või omastada kindlaid (nt hüdrofoobsemaid) ühendeid.

P. putida välispinnal on valgud LapF ja LapA. Pinnavalgud mõjutavad bakteri rakupinna hüdrofoobsust, hüdrofoobsed ühendid imenduvad bakterirakku või tõrjutakse eemale vastavalt välispinna hüdrofoobsusele.

Rakud on eksponentsiaalses faasis hüdrofiilsemad, statsionaarses faasis hüdrofoobsemad. Hüdrofiilsus eksponentsiaalses faasis on väga oluline toitainete omastamiseks – nii saavad rakud omastada hüdrofiilseid toitaineid, näiteks glükoosi. Statsionaarses faasis muutub rakupind hüdrofoobseks – toitaineid enam ei omastata (Pletnev jt., 2015).

Globaalse regulaatori Fis abil toimub rakupinna hüdrofoobsuse regulatsioon, regulaatorvalk surub *lapF* geeni ekspressiooni alla. Fis üleekspresseerivates tüvedes on rakud statsionaarses faasis hüdrofiilsemad – LapF-i tootev *P. putida* on hüdrofoobsem, valgu puudumisel on bakteri välispind hüdrofiilsem. (Lahesaare, 2011; Lahesaare jt., 2016).

LapF geeni deleteerimine põhjustab rakkude hüdrofiilsuse säilimise ka statsionaarses faasis. Samalaadne mõju on *fis*-i üleekspressioonil – *LapF*-i hulk rakus langeb ja rakud on hüdrofiilsemad. *Fis*-i üleekspresseerivad rakud moodustavad LB-s siiski biofilmi rohkem kui metsiktüvi – võimalik, et *lapF* on seotud eelkõige just hüdrofoobsusega, mitte biofilmi moodustamisega (Lahesaare jt., 2016).

LapF võib olla justkui bakteri kaitsemehhanism – selle olemasolu põhjustab hüdrofoobsust ja seega võimaldab hüdrofiilseid aineid tõrjuda. On ka võimalik, et hüdrofoobsed bakterid kogunevad eriti tihedalt biofilmis kokku ja on tänu sellele ümbritsevas keskkonnas leiduvate toksiliste ühendite suhtes vastupidavamad (Lahesaare, 2011). *LapF* rolli seoses toksiliste ühendite tõrjumisega on vaja aga põhjalikumalt uurida, enne kindlate järelduste tegemist.

2. Uurimus

2.1. Töö eesmärgid

Meie laboris tehtud katsetest on järeldatud, et *P. putida* pinnavalk LapF mõjutab rakupinna hüdrofoobsust. Kuna bakteriraku pind mõjutab keskkonnas leiduvate ühendite omastamist, siis püstitasin hüpoteesi, et taimemetaboliitide mõju *P. putida* kasvule ja biofilmi moodustumisele sõltub LapF-i olemasolust. Täpsemalt – mida hüdrofiilsem on kemikaal, seda enam sõltub tema efekt LapF-st.

Eesmärgiks oli hinnata nelja taimemetaboliidi või taimemetaboliidi-laadse kemikaali mõju *P. putida* metsiktüvele PSm, selle *lapF*-deletandile ja IPTG-ga *lapF* transkriptsiooni indutseeritavale tüvele PSmlapF3. Nii sain teha kindlaks, kas LapF mõjutab erineva hüdrofoobsusega ainete imendumist *P. putida* rakkudesse ja seega nii bakterite kasvu kui biofilmi moodustumist.

2.2. Materjal ja meetodika

2.2.1. *Pseudomonas putida* tüved ja kasvatamine

Baktereid kasvasin defineeritud M9 glc CAA söötmes, mis sisaldas M9 puhvrit (42 mM KH_2PO_4 , 24 mM Na_2HPO_4 , 19 mM NH_4Cl , 9 mM NaCl), mikroelementide lahust (2,5 ml/l) (Bauchop ja Elsdén, 1960), glükoosi lõppkontsentratsiooniga 0,2% ja kaseiini hüdroolüsaati CAA-d lõppkontsentratsiooniga 0,2%, millele oli lisatud L-trüptofaani (20 µg/ml) PSmKm ja PSmlapF3 tüvedele lisasin *lapF* ekspressiooni indutseerimiseks 1 mM lõppkontsentratsiooniga IPTG-d. Seejärel lisasin söötmele kemikaale naatriumsalitsülaati, vesinikperoksiidi, katehhooli või *paraquat*'i. Töös kasutasin nelja *P. putida* tüve: metsiktüvi PSm, deleteeritud *lapF*-ga tüvi PSm Δ lapF ja IPTG-ga *lapF*-i transkriptsiooni indutseeritav tüvi PSmlapF3 ning selle kontrolltüvi PSmKm, mis sisaldas geeni *lapF*-i ees Km-resistentsusgeeni, kui *lapF*-l oli oma promootor (tabel 1).

Tabel 1. Töös kasutatud *P. putida* tüved ja nende iseloomustused

<i>P. putida</i> tüvi	Iseloomustus/genotüüp	Allikas
PSm	PaW85; <i>glmS</i> geeni järele inserteeritud mini Tn7- Ω Sm kassett (Sm ^r); metsiktüvi	(Jakovleva jt., 2012)
PSm Δ lapF	PSm; Δ lapF (PP_0806)	(Lahesaare, 2011)
PSmKm	PSm; Km ^r geen 355 bp ülesvoolu <i>lapF</i> kodeerivast geenist	(Lahesaare jt., 2016)
PSmlapF3	PSm; 200 bp pikkune DNA ülesvoolu <i>lapF</i> geenist on asendatud 1,9 kb lacI ^q - Ptac (Km ^r , Sm ^r)	(Lahesaare jt., 2016)

Töös kasutasin 4 erinevat kemikaali, mille logP ja maksimaalne vees lahustuvus on toodud tabelis 2 (Pubchem). Kemikaalide puhul kasutasin kontsentratsioonirida: Na-salitsülaad: 0,5 mM kuni 32 mM, vesinikperoksiid: 1 mM kuni 64 mM. katehhool: 0,4 mM kuni 25,6 mM ja *paraquat*: 0,09375 mM kuni 6 mM. Iga järgmine kontsentratsioon oli 2 korda suurem eelmisest

Tabel 2. Töös kasutatud kemikaalide hüdrofoobsused ja vees lahustuvus Pubchem-i järgi

Kemikaal	logP ¹	Lahustuvus (g/l vee kohta)	Maksimaalne kontsentratsioon vees (M)
Naatriumsalitsülaad (NS)	-1,43	124,878	0,78
Vesinikperoksiid (H ₂ O ₂)	-0,43	täielik	29,4
Katehhool	-4,5	619,7556	2,41
<i>Paraquat</i>	0,88	461,3609	4,19

¹Mida kõrgem logP, seda hüdrofoobsem on ühend

Kasvukõvera parameetrite uurimiseks külvasin *P. putida* tüved 5 ml M9 glc CAA defineeritud söötmesse ning kasvasin baktereid üleöö 180 rpm 30 °C loksutil. PSmKm ja PSm lapF3 tüved külvasin ka M9 söötmesse, kuhu lisasin IPTG-d (lõppkontsentratsiooniga 1 mM). Hindasin generatsiooniga ning max-OD, mille leidmiseks kasutasin Gompertz mudelit (Dalgaard ja Koutsoumanis, 2001).

Greiner Bio-One International mikrotiiterplaadile 655185 külvasin üleöö kasvatatud rakud 2,5 µl rakke 130 µl söötmesse, millele lisasin vastavalt uuritavaid kemikaale (v.a kontrollrakud, mille kasvasin kemikaalideta). IPTG-ga ette kasvatatud PSmKm ja LapF3 tüvede puhul lisasin mikrotiiterplaadi söötmesse IPTG-d (1 mM lõppkontsentratsioon). Eelnevalt hindasin üleöö kasvatatud bakterirakkude optilist tihedust. Kuna kõigi tüvede puhul oli see suhteliselt sarnane (A_{580} oli u 4), siis töö lihtsustamiseks külvasin mikrotiiterplaadile samas mahus rakke.

Rakke kasvasin temperatuuril 30 °C POLARstar Omega spektrofotomeetris, mis mõõtis optilist tihedust iga 7 minuti järel 24 h jooksul. Saadud andmete põhjal koostasid bakterikultuuride kasvukõverad. Kasvukõveraid hindasin 4 tehnilise korduse põhjal.

2.2.2. *P. putida* biofilmi biomassi mõõtmine

Biofilmi biomassi uurimise protsess oli analoogne kasvukõverate uurimisele – sööde, tüved ja kemikaalid olid samad. Erinevuseks on mikrotiiterplaat, millele rakud külvasin (Greiner Bio-One International 655180) ning biofilmi mõõtmise meetodika. Biofilmi analüüsimiseks tegin 3 bioloogilist kordust, millest igaüks sisaldas 4 tehnilist kordust.

Biofilmi kasvasin 24 h 30 °C termostaadis. Kasvatamise järel värvisin rakke 1% kristallviolett-lahusega, mida hoidsin rakkudel 15 min. Seejärel eemaldasid värvi ja rakkude segu kaevust ning loputasin 3 korda MilliQ veega kõik kaevud üle. Kaevudesse lisasin 180 µl 96% etanooli, et biofilmi kinni jäänud värv kätte saada. Etanoolil lasin mikrotiiterplaadil 10 min mõjuda, tõstsin puhtasse mikrotiiterplaati, siis eraldasid kristallvioleti veel korra sama koguse etanooliga. Värvunud etanooli lahjendasin 1:2 veega (100 µl etanooli-värvisegu, 200 µl MilliQ) mikrotiiterplaadil Greiner Bio-One International 655101, seejärel mõõtsin neeldumist 540 nm lainepikkusel.

2.2.3. Statistiline analüüs

Statistiliseks analüüsiks kasutasin programmi Statistica (versioon 13.5.0.17). Tulemuste analüüsimiseks kasutasin multifaktoriaalset ANOVA analüüsi usaldusnivooga 0,05. Statistica programmi abil arvutasin ka usalduspiirid (95%, joonistel) ja P-väärtused. Töös on biofilmi biomassi puhul välja toodud ainult sõltumatute faktorite peamõjud ja nende koosmõju.

2.3. Tulemused

2.3.1. *P. putida* kasvu muutused kemikaalide mõjul

Uurimaks kemikaalide mõju *P. putida* planktilistele rakkudele, külvasin rakud M9 söötmesse, kuhu lisasin kemikaale – NSi, katehhooli, H₂O₂, *paraquat*'i. Rakke kasvasin 24 h mikrotiiterplaadil, kasvukõverast arvutasin Gompertz mudeli põhjal generatsiooniaja (Dalgaard ja Koutsoumanis, 2001).

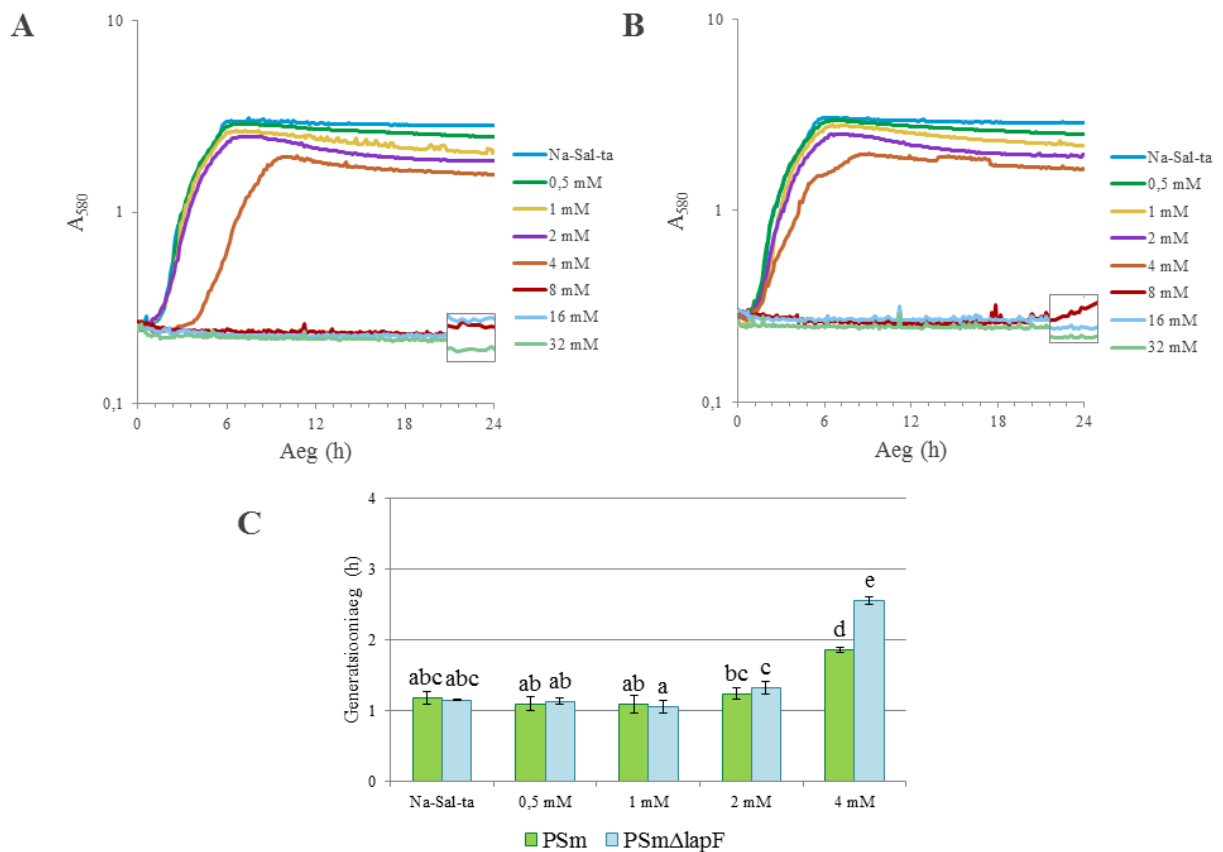
Generatsiooniaeg on aeg, mille jooksul bakterirakkude arv kultuuris kahekordistub. Mida lühem on generatsiooniaeg, seda kiiremini bakterirakud kasvavad ehk seda efektiivsemalt toimub C-allika muutmine biomassiks. Kui keskkonnas leidub toksiline aine, kulub osa süsinikust toksilise mõju leevendamiseks, biomassi toodetakse seega vähem (Moat et al., 2002). Lag-faasi pikkust ma ei hinnanud – Gompertzi mudeli puhul osutus lag-faasi pikkuse hindamine komplitseerituks (andmeid pole toodud).

Kemikaalide kontsentratsioonid valiti välja biofilmi mõõtmise varasematest katsetest või konsultatsioonist PhD Signe Viggori ja PhD Merike Merimaaga, kes on teinud sarnaste kemikaalidega katseid (personaalne konsultatsioon).

P. putida planktiliste rakkude kasvu mõjutasid kõik kemikaalid negatiivselt. Mida rohkem kemikaali söötmesse lisati, seda rohkem langes generatsiooniaeg, kuni teatud kontsentratsioonist alates ei suutnud bakterid söötmes kasvu alustada (joonised 1-7).

Na-salitsülaadi mõju *P. putida* generatsiooniajale sai hinnata 4 lahjema kontsentratsiooni puhul (0,5 – 4 mM), sest 8 mM NS oli rakkude jaoks nii toksiline, et rakud ei kasvanud (joonis 1). Generatsiooniaja pikkuste hindamisel määrasin F-statistiku ning faktortunnuste „tüvi“ ja „kemikaal“ pea- ning koosmõjud.

Kahefaktorilise ANOVA-s kasutasin metsiktüve PSm ja *lapF*-deletsioontüve PSm Δ lapF tulemusi, mis sain 0,5 – 4 mM NS lisamisel M9 glc CAA söötmesse, lisaks veel kontrollgrupp, kuhu NS ei lisanud ($F=10158,56$; $df=1$; $p<0,0001$).

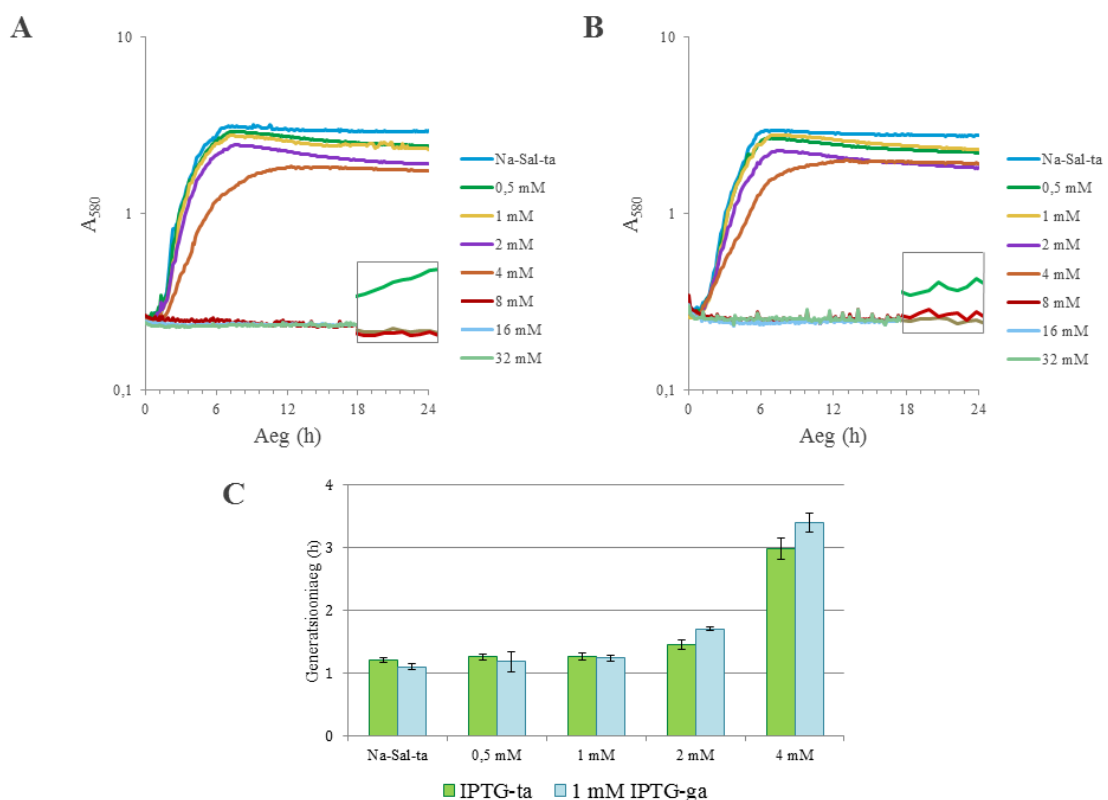


Joonis 1. *P. putida* kasv M9 glc CAA söötmes, millele on lisatud Na-salitsülaati. Kasutatud NS kontsentratsioonid on toodud legendis või tulpdiagrammide all. Kontrollile pole NS lisatud. Toodud on 4 paralleeli aritmeetilised keskmised. A – *P. putida* metsiktüve PSm kasvukõverad. B – *P. putida* *lapF*-deletantse tüve PSm Δ lapF kasvukõverad. Jooniste A ja B paremas nurgas on suurendus graafikul kattuvatest kasvukõveratest näitamaks, missugused jooned kattuvad. C – *P. putida* tüvede generatsiooniaegade aritmeetilised keskmised ja 95% usalduspiirid ning homogeensusgrupid. Kui homogeensusgrupid on tähistatud sama tähega, siis gruppide vahel statistilist erinevust ei ole ($p \geq 0,05$).

Faktortunnuse „tüvi“ peamõju andis statistiliselt olulise erinevuse tüvede vahel ($F=5,29$; $df=1$; $p=0,029$). Faktortunnus „kemikaal“ põhjustas gruppide vahel statistilist erinevust ($F=115,96$; $df=4$; $p<0,0001$), mis oli ka oodatav, sest NS lisamine oli silmnähtava negatiivse efektiga *P. putida* kasvule (joonis 1A, 1B). Faktortunnuste koosmõju põhjustas gruppide vahel samuti statistiliselt olulist erinevust ($F=4,03$; $df=4$; $p=0,01$). Teisisõnu, tüved käitusid NS juuresolekul erinevalt (joonis 1C).

Bonferroni järeldest näitas, et 4 mM NS lisamine söötmesse pikendas statistiliselt olulisel määral nii metsiktüve PSm kui ka *lapF*-deletanttüve PSm Δ lapF generatsiooniaega (joonis 1C). PSm generatsiooniaeg pikenes 1,6 korda, *lapF*-deletanttüve generatsiooniaeg 2,2 korda võrreldes generatsiooniaegadega, mis saadi NSta söötmes rakkude kasvatamisel ($g_{\text{PSm NS}[0]} = 1,18$ versus $g_{\text{PSm NS}[4]} = 1,86$; $p < 0,0001$ ja $g_{\text{PSm}\Delta\text{lapF NS}[0]} = 1,15$ versus $g_{\text{PSm}\Delta\text{lapF NS}[4]} = 2,25$; $p < 0,0001$; joonis 1C). Ainuke erinevus tüvede vahel ilmnes samuti 4 mM NS korral, kui tüvede generatsiooniaeg erines üksteisest 1,37 korda ($g_{\text{PSm}} = 1,86$ ja $g_{\text{PSm}\Delta\text{lapF}} = 2,55$; $p < 0,0001$; joonis 1C).

Kasutasin töös positiivse kontrollina tüve PSmlapF3, millel saab *lapF* transkriptsiooni indutseerida IPTG-ga (joonis 2). Söötmesse 1 mM IPTG lisamise tulemusel ekspresseerub *lapF* ja rakud muutuvad hüdrofoobsemaks, kui *lapF*-deletanttüvi (Lahesaare jt., 2016). Tüve PSmlapF3 generatsiooniaja analüüsimisel kasutasin faktortunnuseid „kemikaal“ ja „IPTG“,

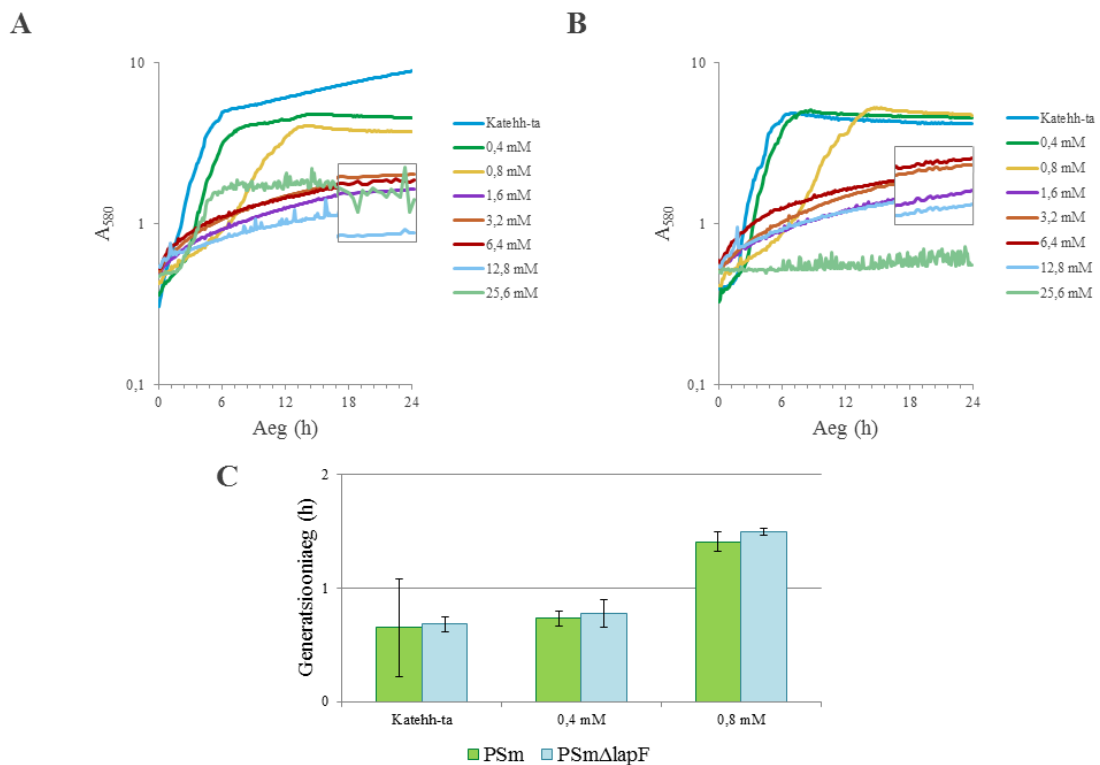


Joonis 2. *P. putida* tüve PSmlapF3 kasv M9 glc CAA söötmes, millele on lisatud Na-salitsülaati. Kasutatud NS kontsentratsioonid on toodud legendis või tulpdiagrammide all. Kontrollile pole NS lisatud. Toodud on 4 paralleeli aritmeetilised keskmised. A – *P. putida* tüve PSmlapF3 kasvukõverad, IPTG-d pole lisatud. B – *P. putida* PSmlapF3 tüve kasvukõverad, millele on lisatud *lapF* geeni ekspressiooniks 1 mM IPTG-d. Jooniste A ja B paremas nurgas on suurendus graafikul kattuvatest kasvukõveratest, näitamaks millised jooned kattuvad. C – *P. putida* PSmlapF3 generatsiooniaegade aritmeetilised keskmised ja 95% usalduspiirid.

kuna uuritav tüvi oli sama. ANOVA ($F=9557,81$; $df=1$; $p<0,0001$) järgi põhjustas statistiliselt olulise erinevuse ainult faktortunnus „kemikaal“ ($F=56,96$, $df=4$; $p<0,0001$). Kemikaali mõju oli oodatav – kasvukõveratelt oli selgelt näha NS negatiivne toime rakkude kasvule (joonis 2A, B). Faktortunnus „IPTG“ ei põhjusta gruppide vahel statistilisi erinevusi ($F=2$; $df=1$; $p=0,167$) ning faktortunnuste koosmõju ei põhjusta samuti gruppide vahel statistiliselt olulisi erinevusi ($F=1,76$; $df=4$; $p=0,161$). Järelikult IPTG-ga indutseerides ei teki tüve PSm Δ lapF3 generatsiooniajas muutusi (joonis 2C) ning järeltestid pole vajalikud.

Kokkuvõtvalt, LapF-i puudumisel kasvavad rakud Na-saltsülaadi juuresolekul halvemini. PSm Δ lapF3 tulemused LapF olulisust siiski välja ei too.

Katehhool mõjub rakkude kasvule pärssivalt (joonis 3 ja 4) ($F=241,444$; $df=2$; $p<0,0001$).

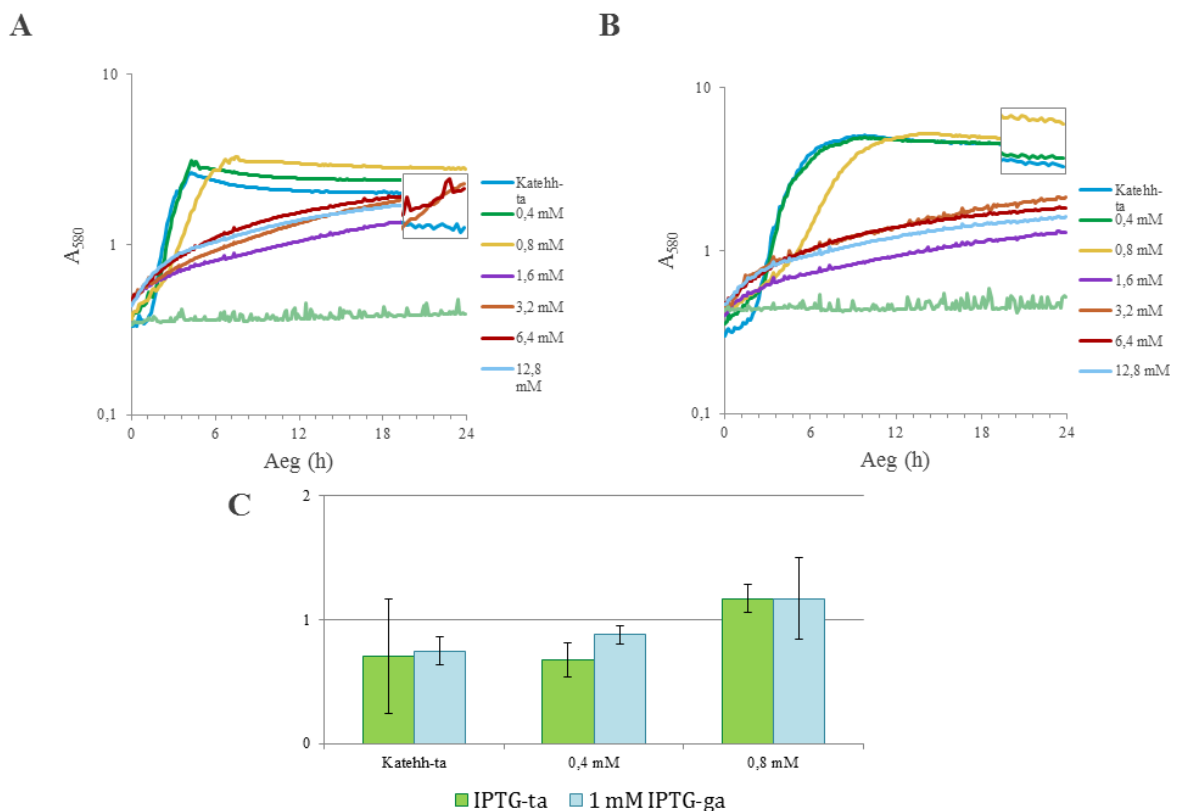


Joonis 3. *P. putida* kasv M9 glc CAA söötmes, millele on lisatud katehhooli. Kasutatud katehhooli kontsentratsioonid on toodud legendis või tulpdiaagrammide all. Kontrollile pole katehhooli lisatud. Toodud on 4 paralleeli aritmeetilised keskmised. A – *P. putida* tüve PSm kasvukõverad. B – *P. putida* lapF-deletantse tüve PSm Δ lapF kasvukõverad. Jooniste A ja B paremal poolel on suurendus graafikul kattuvatest kasvukõveratest, näitamaks, millised jooned kattuvad. C – *P. putida* tüvede generatsiooniaegade aritmeetilised keskmised ja 95% usalduspiirid.

Tüvede PSm ja PSm Δ lapF generatsiooniajal statistiliselt olulist vahet ei olnud ($F=0,7434$; $df=1$; $p=0,3892$), ka tüvi ja kemikaal koos ei mõjunud rakkude generatsiooniajale

märkimisväärselt ($F=0,1685$; $df=7$; $p=0,9912$). Kuna kahe faktortunnuse koosmõju puudus, polnud järeldamiseks vajadust (joonis 3).

Alates katehhooli kontsentratsioonist 1,6 mM on *P. putida* kasv häiritud või puudub, mistõttu sain tüvedel generatsiooniaegu arvutada vaid 0 – 0,8 mM kontsentratsioonide puhul (joonis 3). Sarnaselt NSle on katehhooli lisamisel PSm ja PSm Δ lapF generatsiooniaeg pikem, mida rohkem katehhooli lisada (joonis 3C).

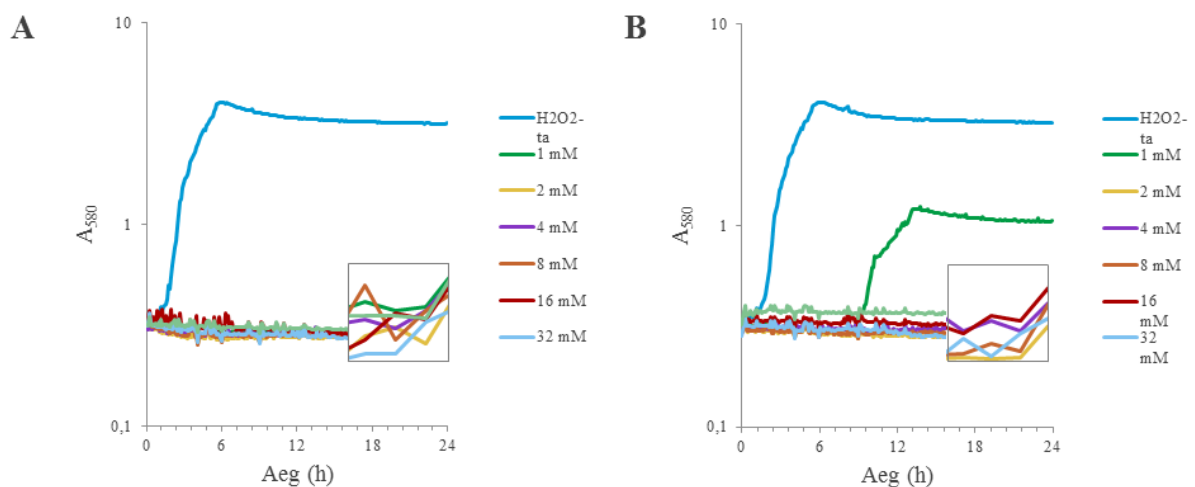


Joonis 4. *P. putida* kasv M9 glc CAA söötmes, millele on lisatud katehhooli. Kasutatud katehhooli kontsentratsioonid on toodud legendis või tulpdiaagrammide all. Kontrollile pole katehhooli lisatud. Toodud on 4 paralleeli aritmeetilised keskmised. A – *P. putida* tüve PSmlapF3 kasvukõverad, IPTG-d pole lisatud. B – *P. putida* PSmlapF3 tüve kasvukõverad, millele on lisatud *lapF* geeni ekspressiooniks IPTG-d. Jooniste A ja B paremal poolel on suurendus graafikul kattuvatest kasvukõveratest, näitamaks millised jooned kattuvad. C – *P. putida* tüvede generatsiooniaegade aritmeetilised keskmised ja 95% usalduspiirid.

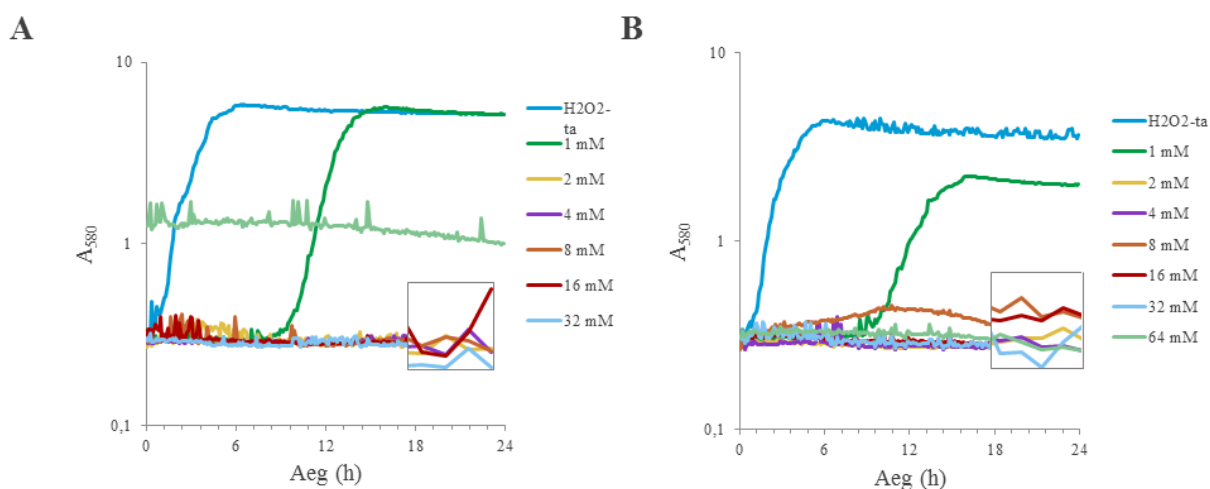
Nagu PSm ja PSm Δ lapF tüvede puhul, mõjus katehhool negatiivselt ka PsmlapF3 tüve kasvule, nii ilma IPTG-ta kui IPTG lisamisel ($F=27,227$; $df=2$; $p<0,0001$) (Joonis 4C). Faktortunnuse „IPTG“ ning tunnuste „IPTG“ ja „kemikaal“ koosmõju puudus.

0,4 mM katehhooli kontsentratsiooni juures olid generatsiooniajad umbes sama pikad, kui kemikaalita kontrollil. 0,8 mM kontsentratsiooni juures oli näha generatsiooniaja pikenemist (joonis 4).

Vesinikperoksiidi mõju uurimisel kasutasin kontsentratsioone vahemikus 1 – 64 mM. Juba 1 mM kontsentratsioonis oli vesinikperoksiid rakkudele niivõrd toksiline, et kõik paralleelid ei suutnud kasvada. Seetõttu oleks vajalik katset korrata madalamate vesinikperoksiidi kontsentratsioonide juures. LapF tähtsust hinnata ega homogeensusgruppe leida samuti ei saa (joonis 5 ja 6).

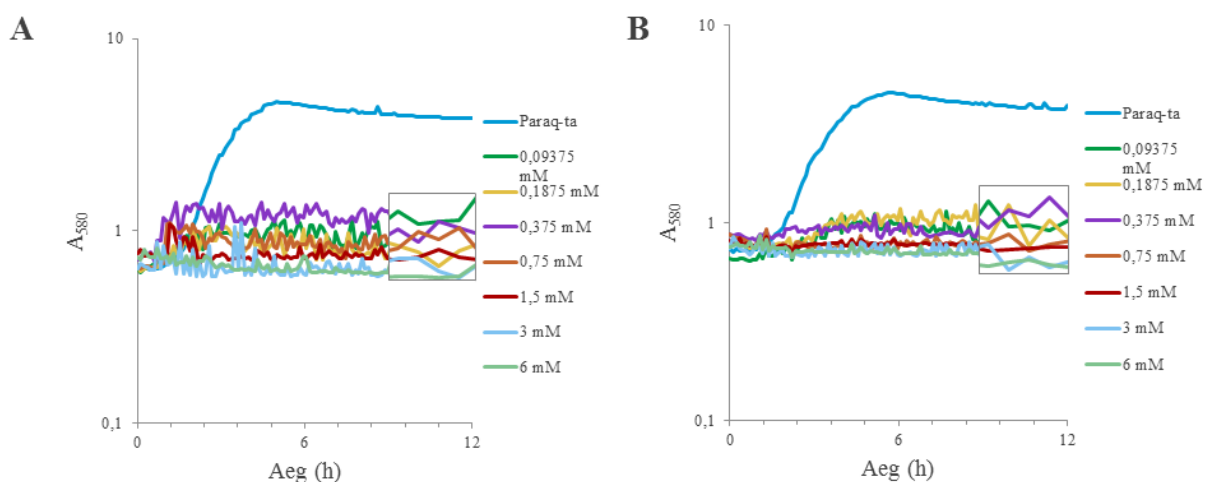


Joonis 5. *P. putida* kasv M9 glc CAA söötmes, millele on lisatud vesinikperoksiidi. Kasutatud H₂O₂ kontsentratsioonid on toodud legendis. Kontrollile pole vesinikperoksiidi lisatud. Toodud on 4 paralleeli aritmeetilised keskmised. A – *P. putida* metsiktüve PSm kasvukõverad. B – *P. putida* *lapF*-deletantse tüve PSmΔ*lapF* kasvukõverad. Jooniste A ja B paremas nurgas on suurendus graafikul kattuvatest kasvukõveratest, näitamaks millised jooned kattuvad.

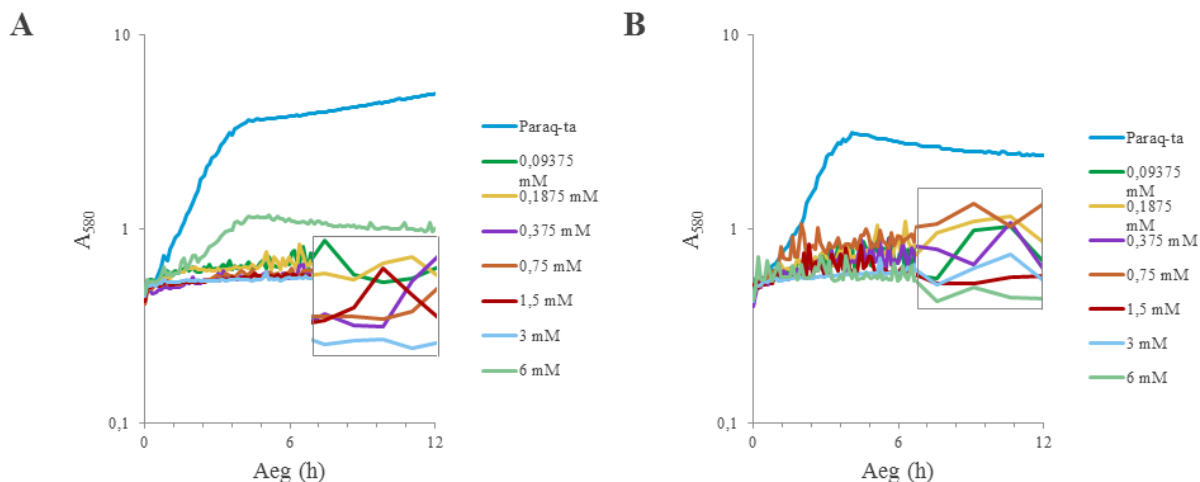


Joonis 6. *P. putida* kasv M9 glc CAA söötmes, millele on lisatud vesinikperoksiidi. Kasutatud H_2O_2 kontsentratsioonid on toodud legendis. Kontrollile pole vesinikperoksiidi lisatud. Toodud on 4 paralleeli aritmeetilised keskmised. A – *P. putida* tüve PSmlapF3 kasvukõverad, IPTG-d pole lisatud. B – *P. putida* PSmlapF3 tüve kasvukõverad, millele on lisatud *lapF* geeni ekspressiooniks IPTG-d. Jooniste A ja B paremas nurgas on suurendus graafikul kattuvatest kasvukõveratest, näitamaks millised jooned kattuvad.

Sarnaselt vesinikperoksiidile mõjus *paraquat* rakkudele nii toksiliselt, et generatsiooniaega ei saanud arvutada. Samal põhjusel polnud võimalik LapF tähtsuse hindamine ja homogeensusgruppide leidmine (Joonis 7 ja 8).



Joonis 7. *P. putida* kasv M9 glc CAA söötmes, millele on lisatud *paraquat*'i. Kasutatud *paraquat*'i kontsentratsioonid on toodud legendis. Kontrollile pole *paraquat*'i lisatud. Toodud on 4 paralleeli aritmeetilised keskmised. A – *P. putida* tüve PSm kasvukõverad. B – *P. putida* *lapF*-deletantse tüve PSmΔ*lapF* kasvukõverad. Jooniste A ja B paremas nurgas on suurendus graafikul kattuvatest kasvukõveratest, näitamaks millised jooned kattuvad.



Joonis 8. *P. putida* kasv M9 glc CAA söötmes, millele on lisatud *paraquat*'i. Kasutatud *paraquat*'i kontsentratsioonid on toodud legendis. Kontrollile pole *paraquat*'i lisatud. Toodud on 4 paralleeli aritmeetilised keskmised. A – *P. putida* tüve PSmlapF3 kasvukõverad, IPTG-d pole lisatud. B – *P. putida* PSmlapF3 tüve kasvukõverad, millele on lisatud *lapF* geeni ekspressiooniks IPTG-d. Jooniste A ja B paremas nurgas on suurendus graafikul kattuvatest kasvukõveratest, näitamaks millised jooned kattuvad.

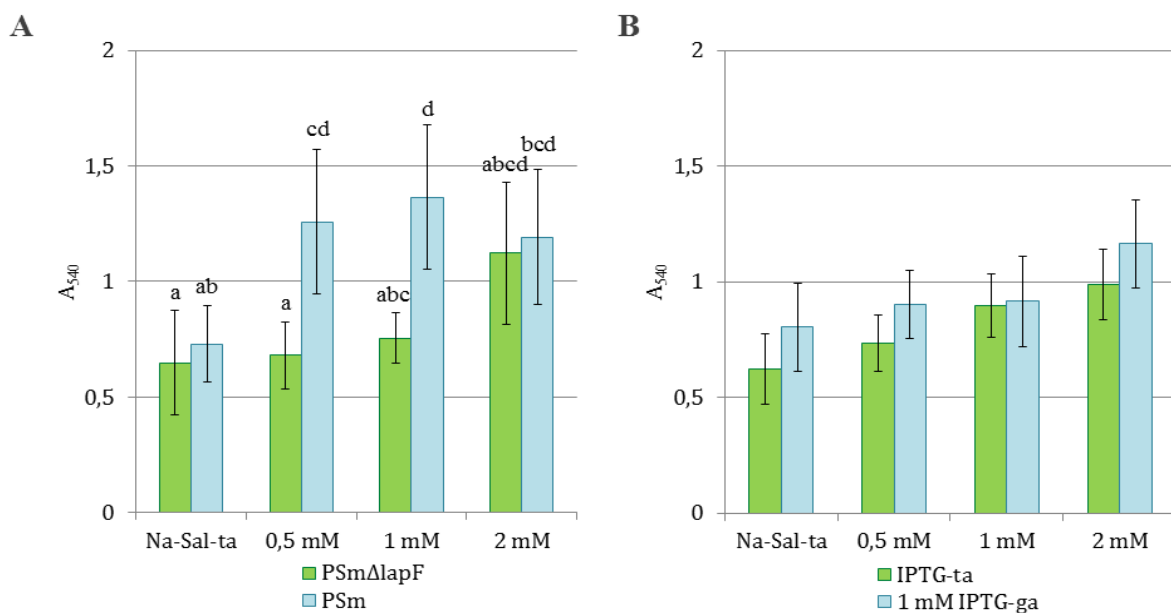
2.3.2. Biofilmi biomassi moodustamine

Biofilmi biomassi uurimine oli sarnane generatsiooniaegade määramisele. Külvasin rakud mikrotiiterplaadile ning kasvasin 24 h temperatuuril 30 °C. Seejärel mõõtsin kaudselt moodustunud biofilmi massi, värvides rakke kristallvioletiga.

Nagu rakkude generatsiooniaja puhul oli kõikidel kemikaalidel biofilmi biomassile märkimisväärne mõju (joonised 9-12). Na-salitsülaad ja katehool mõjusid biofilmi biomassile positiivselt, oksüdeerivad ühendid *paraquat* ja vesinikperoksiid negatiivselt. Üldiselt olid bakterid biofilmis tundetumad kemikaalidele, kui planktilised rakud.

NS puhul kasutasin kontsentratsioone 0,5 mM kuni 32 mM, kontrollgrupile NSi ei lisanud (joonis 9 ja lisa 1).

Kahefaktorilises ANOVA-s kasutasin metsiktüve PSm ja *lapF*-deletsioontüve PSmΔ*lapF* tulemusi. Tulemused sain 0,5 mM, 1 mM ja 2 mM NS lisamisel M9 glc CAA söötmesse, lisaks veel kontrollgrupp, kuhu NSi ei lisanud ($F=597,725$; $df=1$; $p<0,0001$).



Joonis 9. Naatriumsalitsülaadi mõju *P. putida* biofilmi biomassile. Toodud on biofilmide biomasside aritmeetilised keskmised 95% usalduspiiridega. Kasutatud Na-salitsülaadi kontsentratsioonid on toodud tulpdiagrammide all. Kontrollile pole Na-salitsülaati lisatud. A – Metsiktüve PSm ja *lapF*-deletanttüve PSmΔ*lapF* biofilmi biomass ning homogeensusgrupid. Kui homogeensusgrupid on tähistatud sama tähega, siis gruppide vahel statistilist erinevust ei ole ($p \geq 0,05$). B – IPTG-ga kontrollitav *lapF*-i ekspressioonitüve PSm*lapF3* IPTG-ga ja IPTG-ta moodustunud biofilmi biomass ($n=3$).

Faktortunnuse „tüvi“ peamõju põhjustab gruppides statistiliselt olulisi erinevusi ($F=17,828$; $df=1$; $p<0,0001$), millest saab järeldada, et tüved reageerivad kemikaalile erinevalt. Faktortunnuse „kemikaal“ peamõju on samuti statistiliselt oluline ($F=6,451$; $df=3$; $p=0,0005$). See vastab generatsiooniaegade tulemusele – NS mõjutas *P. putida*’l ka planktiliste rakkude kasvu.

Tähtis on ka kahe faktori koosmõju – see näitab, kas LapF olemasolu mõjutab NS sisaldavas keskkonnas biofilmi moodustumist. Faktortunnuste „tüvi“ ja „kemikaal“ koosmõju põhjustas gruppide vahel statistiliselt olulisi erinevusi ($F=3,565$; $df=3$; $p=0,0173$). Sellest võib järeldada, et bakteri biofilmi moodustamine NS sisaldavas keskkonnas on mõjutatud LapF-ist (joonis 9A).

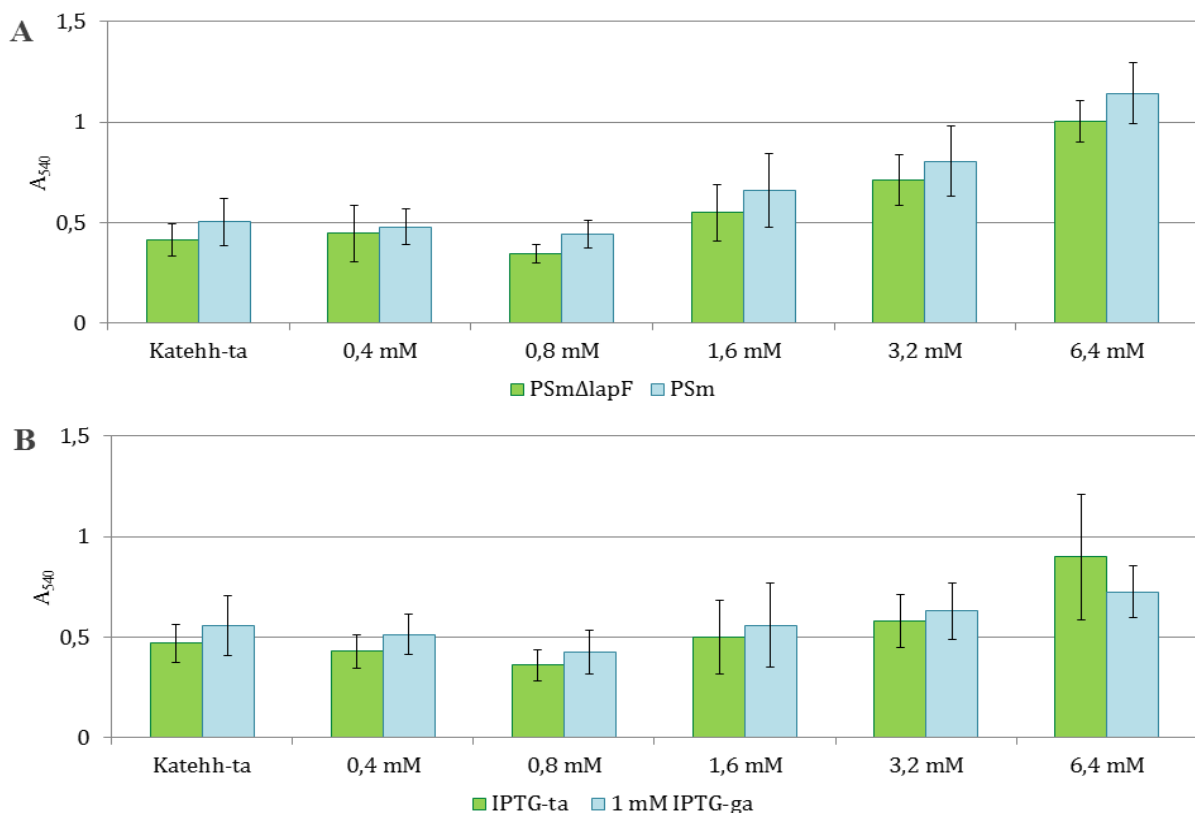
Bonferroni järeltesti järgi on biofilmi moodustumine tüvedel PSm ja PSmΔ*lapF* statistiliselt oluliselt erinev, kui söötmesse on lisatud 0,5 mM ja 1 mM NS (joonis 9A). Kui söötmesse on lisatud 0,5 mM NS, siis metsiktüve PSm biofilmi biomass on 1,85 korda suurem kui PSmΔ*lapF*-l ($A_{\text{PSm NS}[0,5]} = 1,26$ ja $A_{\text{PSm}\Delta\text{lapF NS}[0,5]} = 0,68$; $p=0,013$). 1 mM NS

kontsentratsioonil on PSm tüve biofilmi biomass *lapF*-deletanttüve omast 1,81 korda suurem ($A_{PSm\ NS[1]} = 1,36$ ja $A_{PSm\Delta lapF\ NS\ [1]} = 0,76$; $p=0,006$).

PSmF3 tüve biofilmi biomassile mõjuvad statistiliselt olulisel määral nii faktortunnus „IPTG“ ($F=6,72$; $df=1$; $p=0,011$) kui faktortunnus „kemikaal“ ($F=8,688$; $df=0,000041$; $p<0,0001$). Koosmõju pole statistiliselt oluline, seega pole ANOVA järeldest vajalik. 4 mM NS põhjustab IPTG-ta rakkude biofilmi biomassi suurenemise 1,59 korda, IPTG lisamisel on rakkude biomass 1,45 korda suurem ($A_{PSmF3\ NS[0]} = 0,62$ versus $A_{PSmF3\ NS\ [4]} = 0,99$; $A_{PSmF3+IPTG\ NS[0]} = 0,80$ versus $A_{PSmF3+IPTG\ NS\ [4]} = 1,16$).

Kui *P. putida* rakkudele lisada NS, siis on metsiktüve biofilmi biomass 1,37 suurem võrreldes *lapF*-deletanttüvega. IPTG-ga *lapF* indutseeritava tüve PSm Δ lapF3 puhul ei ole IPTG lisamisel märkimisväärset mõju.

Katehhooli kontsentratsioonid, mida katses kasutasin, olid vahemikus 0,4 mM kuni 6,4 mM. Kontrollgrupile kemikaali ei lisanud. Katehhool mõjub *P. putida* biofilmi moodustamisele kontsentratsiooni kasvades positiivselt ($F=36,720$; $df=5$; $p<0,0001$). PSm ja PSm Δ lapF tüved on samuti statistiliselt erinevad ($F=7,503$; $df=1$; $p=0,0066$) (Joonis 10A). Kuna tüve ja kemikaali koosmõju puudub, ei olnud ANOVA järeldest vajalik.



Joonis 10. Katehhooli mõju *P. putida* biofilmi biomassile. Toodud on biofilmi biomasside aritmeetilised keskmised 95% usalduspiiridega. Kasutatud katehhooli kontsentratsioonid on toodud tulpdiagrammide all. Kontrollile pole katehhooli lisatud. A – Metsiktüve PSm ja lapF-deletanttüve PSmΔlapF biofilmi biomass B – IPTG-ga kontrollitav lapF-i ekspressioonitüvi PsmF3 IPTG-ga ja IPTG-ta moodustunud biofilmi biomass (n=3).

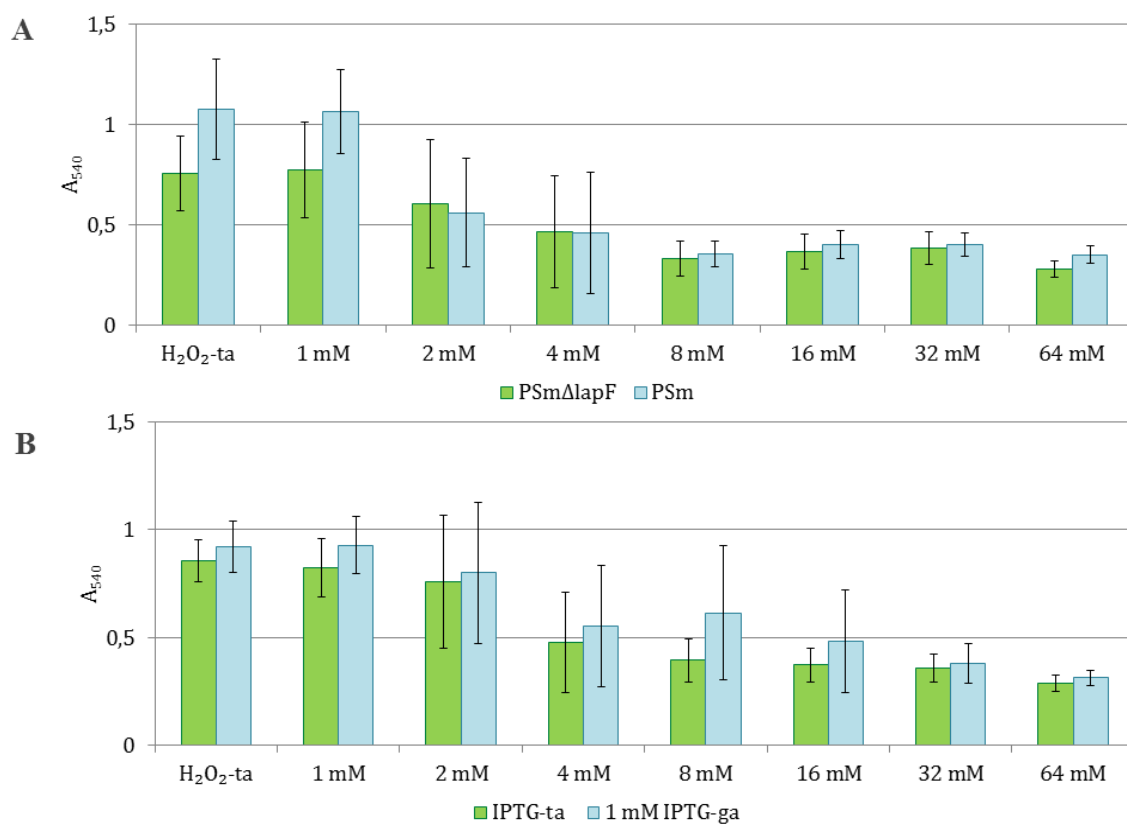
PSmF3 tüvele mõjub kemikaal sarnaselt – biofilmi biomassi hulk tõuseb katehhooli mõjul ($F=7,4228$; $df=5$; $p<0,0001$). IPTG lisamine muutust ei põhjusta ($F=0,4483$; $df=1$; $p=0,50$) (joonis 10B).

Kokkuvõtvalt, katehhool mõjub biofilmi biomassi moodustamisele soodustavalt. Koosmõju LapF-iga puudub nii metsiktüve ja *lapF*-deletanttüve võrreldes kui IPTG lisamisel PSmF3 tüvele.

Vesinikperoksiidi puhul kasutasin kontsentratsioone 1 mM kuni 64 mM, kontrollgrupile kemikaali ei lisanud (joonis 11).

Vesinikperoksiidil on tugevalt biofilmi biomassi pärssiv mõju. H_2O_2 põhjustab aina kõrgema kontsentratsiooni juures madalama biomassiga biofilmi (Joonis 11). Kemikaali mõju on statistiliselt oluline ($F=16,3662$; $df=7$; $p<0,0001$) – vesinikperoksiid mõjutab tugevalt biofilmi biomassi (joonis 10). Tüved erinevad üksteisest samuti ($F=4,191$; $df=1$; $p=0,042$). Kahe

tunnuse koosmõju aga ei olnud ($F=1,291$; $df=7$; $p=0,257$) (Joonis 11A), mistõttu järeltesti ei teinud.



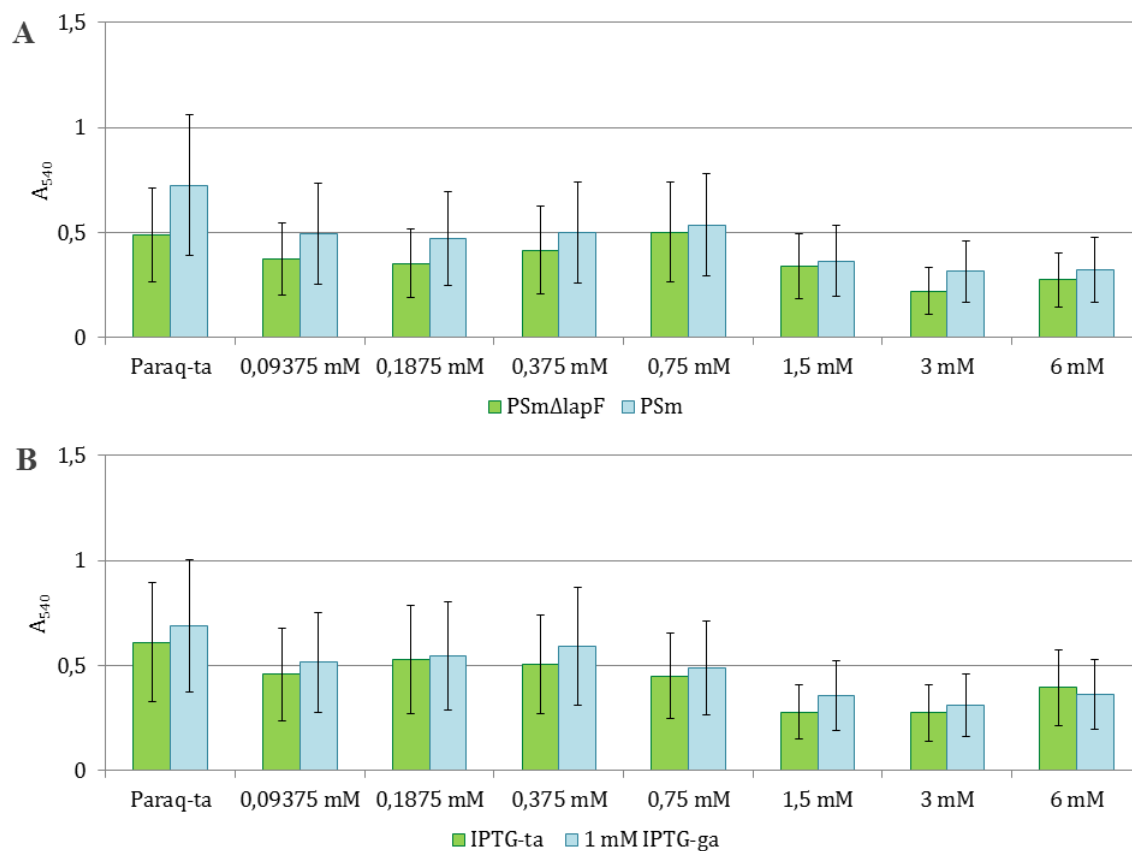
Joonis 11. H₂O₂ mõju *P. putida* biofilmi biomassile. Toodud on biofilmi biomasside aritmeetilised keskmised 95% usalduspiiridega. Kasutatud H₂O₂ kontsentratsioonid on toodud tulpdiaagrammide all. Kontrollile pole H₂O₂ lisatud. A – Metsiktüve PSm ja lapF-deletanttüve PsmΔlapF biofilmi biomass B – IPTG-ga kontrollitav lapF-i ekspressioonitüvi PsmF3 IPTG-ga ja IPTG-ta moodustunud biofilmi biomass (n=3).

PSmF3 tüvele IPTG lisamisel mõju puudus ($F=3,7309$; $df=1$; $p=0,055$). Kemikaalil eraldiseisvalt on biofilmi biomassile mõju ($F=14,4947$; $df=7$; $p=0,0007$) (Joonis 11B). Nii IPTG-ta kui IPTG-ga kasvatatud PsmF3 tüve biomass langeb vesinikperoksiidi lisamisel (joonis 11B).

Kokkuvõtvalt, kasutatud H₂O₂ kontsentratsioonide puhul *P. putida* biofilmi biomass vähenes kõigil uuritud tüvedel sarnaselt. Vesinikperoksiidi lisamisel LapF-l efekti polnud.

Kasutatud *paraquat*'i kontsentratsioonid jäid vahemikku 0,09375 kuni 6 mM, kontrollgruppi söötmesse *paraquat*'i ei lisanud (joonis 12). *Paraquat* mõjub *P. putida* biofilmi biomassile pärssivalt ($F=14,922$; $df=7$; $p<0,0001$). Ka metsiktüvi PSm ja lapF-deletanttüvi PsmΔlapF on märkimisväärselt erinevad ($F=20,873$; $df=1$; $p<0,0001$) (joonis 12A). Kemikaali ja tüve

koosmõju ega kemikaali ja IPTG koosmõju polnud statistiliselt oluline, mistõttu järeltestiks polnud vajadust.



Joonis 12. Paraquat'i mõju *P. putida* biofilmi biomassile. Toodud on biofilmi biomasside aritmeetilised keskmised 95% usalduspiiridega. Kasutatud *paraquat*'i kontsentratsioonid on toodud tulpdiagrammide all. Kontrollile pole *paraquat*'i lisatud. A – Metsiktüve PSm ja lapF-deletanttüve PSmΔlapF biofilmi biomass B – IPTG-ga kontrollitav lapF-i ekspressioonitüvi PSmlapF3 IPTG-ga ja IPTG-ta moodustunud biofilmi biomass (n=3).

PSmlapF3 tüve biofilmi biomass vähenes sarnaselt eelmistele tüvedele, kui lisasin söötmesse *paraquat*'i ($F=14,447$; $df=7$; $p<0,0001$); tüvele IPTG lisamine biofilmi statistiliselt oluliselt ei mõjutanud (joonis 12B).

Paraquat'i lisamine söötmesse pärssis kõikide tüvede biofilmi biomassi teket. Kuigi metsiktüvi ja *lapF*-deletanttüvi on üksteisega võrreldes erinevad, LapF ja *paraquat*'i koosmõju siiski ei esinenud. IPTG lisamine PSmlapF3 tüvele ei mõjutanud biofilmi moodustumist statistiliselt olulisel määral.

2.4. Arutelu

Töös uurisin nelja kemikaali mõju *P. putida* biofilmile ja generatsiooniajale. Kemikaalideks olid taimemetaboliidid või taimemetaboliitide analoogid – kemikaalid on mudeliks taimebakteri interaktsioonile. Seetõttu saab nende ühendite abil modelleerida ka taimejuure koloniseerimist ja bakteri kasvamist risosfääris.

Kasvukiiruste mõõtmiseks olid kontsentratsioonid mõne kemikaali puhul liiga kõrged, biofilmiga seda probleemi ei olnud. Planktilisele rakkudele on kemikaal toksilisem, kuna nende aktiivpind on suurem. Kuna tegemist on ainurakse organismiga, siis kemikaalid saavad raku sisse difundeeruda kogu rakupinna ulatuses. Biofilmis on rakud agregeerinud, mis vähendab nii toitainete kui ka toksiliste ainete difundeerumist rakku. Lisaks takistab biofilmi maatriks kemikaalide difundeerumist. Seega, kemikaalid on planktilistele rakkudele toksilisemad, kui biofilmile (Stewart, 2003). Minu töö tulemused on vastavad – biofilm moodustus ka kemikaali kontsentratsioonidel, mille mõjul planktilised rakud enam ei kasvanud (lisa 1-4, joonis 1-8). Eriti ilmekalt on seda näha vesinikperoksiidi lisamisel söötmesse – kui planktiliste rakkude kasv on häiritud juba 1 mM H₂O₂ puhul ning kasv puudub alates 2 mM H₂O₂ kontsentratsioonist (joonis 5 ja joonis 6), siis *P. putida* tüved moodustasid biofilmi kõigil kasutatud kontsentratsioonidel (joonis 11). Na-salitsülaad oli sarnase efektiga nii planktilistele kui ka sessiilsetele rakkudele biofilmis, mõlemal korral muutus 8 mM Na-salitsülaad rakkudele toksiliseks ning puudus planktiliste rakkude kasv või oli häiritud biofilmi teke (joonis 1, joonis 2 ja joonis 9).

LapF tähtsus avaldus vaid Na-salitsülaadi puhul (joonis 1 ja joonis 9). Kui võrdlesin metsiktüve PSm ja *lapF*-deletanttüve PSmΔ*lapF*, siis LapF olemasolu oli rakkudele kasvu soodustav – metsiktüve biofilmi biomass oli suurem (joonis 1 ja joonis 9). Samas, IPTG-ga *lapF* ekspressioonitüvi PSm*lapF3* ei kinnitanud saadud tulemusi (joonis 2 ja joonis 9). Sellel võib olla mitu põhjust. Võimalik, et tulemus oli juhuslik ja LapF ei kaitse rakke tegelikult Na-salitsülaadi eest. Teine, palju tõenäolisem võimalus on, et IPTG lisamise tulemusel *lapF* ekspressioonitüvi PSm*lapF3* ei tooda piisavalt valku, nii et LapF hüdrofoobsus oleks sarnane metsiktüvele PSm-le. Rakud on küll hüdrofoobsemad kui *lapF*-i deletanttüvi, kuid tõenäoliselt mitte piisavalt hüdrofoobsed, et „käituda“ metsiktüve sarnaselt. Metsiktüvest madalamat rakupinna hüdrofoobsust on PSm*lapF3*-l varem kirjeldatud (Lahesaare 2016).

Seega on pigem probleem PSm*lapF3* tüves – see ei sobi positiivseks kontrolliks. Lisaks – Na-salitsülaadiga saadud tulemused kinnitavad varasemaid tulemusi. Enne on näidatud, et LapF

olemasolul on rakk hüdrofoobne ning tundlikum hüdrofiilsele metanoolile (Lahesaare jt., 2016)

Kuna 8, 16 ja 32 mM Na-salitsülaadi korral pole tegemist biofilmiga, vaid teadmata põhjusel kristallvioleti kinnitumisel mikrotiiterplaadi põhja (Riho Teras, avaldamata andmed), siis jätsin need kontsentratsioonid analüüsist välja (Lisa 1). Välja jäid ka tulemused, mis sain 4 mM NS lõppkontsentratsiooni korral, sest väga lai aritmeetiliste keskmiste 95% usalduspiir annab märku tulemuste kõikumisest. Ilmselt on tegemist nn käänupunktiga – selle NS kontsentratsiooni lisamisel reageerivad bakterid erinevalt. Kord bakter moodustab biofilmi, kord on tegu mittespetsiifilise kristallvioleti kinnitumisega kannu põhja.

Na-salitsülaadi ja katehhooli (salitsüülhappe laguprodukt) ning vesinikperoksiidi ja *paraquat*'i (mõlemad oksüdeerivad ained) mõju oli paarikaupa sarnane. Arvestades kemikaalide kasutust taimes või taime kaitsemehhanismi, mida need kemikaalid matkivad, on sarnasused igati loogilised. Na-salitsülaad ja katehhool on kaitsesignaalidega seotud, salitsüülhappel on taimes aga ülesandeid peale kaasasündinud immuunsuse. Kuna *P. putida* moodustas Na-salitsülaati ja katehhooli (kindla kontsentratsioonini) sisaldavas keskkonnas biofilmi paremini, võib oletada, et ühenditel on oma roll ka risobakterite koloniseerimisprotsessis – selle käigus on väga tähtis just biofilmi teke (joonis 9, joonis 10). Seevastu vesinikperoksiid ja *paraquat*, mille suures hulgas pikaaegne eritamine on seotud just taime vastusega patogeenidele, inhibeerisid biofilmi teket (joonis 11, joonis 12). Kui Na-salitsülaati leidub taimes pidevalt, toodab taim oksüdeerivaid ühendeid suures koguses vaid vajadusel – ROSid on kahjulikud nii taimele kui bakterile, põhjustades koos patogeeniga ka taimeraku surma. Na-salitsülaad ja katehhool on seega pigem biofilmi tekkimist soodustavad ühendid; samas H_2O_2 ja *paraquat* matkivad taime reaktsiooni patogeenile, põhjustades bakterite kiire hukkumise.

Peroksiidi ja *paraquat*'i mõju uurimiseks on vaja katseid madalamate kontsentratsioonidega korrata. Taim eritab vesinikperoksiidi madalamas kontsentratsioonis, kui katses kasutasin – umbes 10-100 μM (Liu jt., 2010). Samas toodab taim palju tugevama mõjuga ROSe, kui ainult vesinikperoksiid, mistõttu oksüdeeriva mõju jäljendamiseks on vaja rohkem vesinikperoksiidi, kui taime eritistes leidub – näiteks vabu hapniku radikaale jt äärmiselt ebastabiilseid ühendeid on väga raske katse jaoks küllalt suures koguses (ja pikaaegselt) toota. Näiteks superoksiidi O_2^- poolestusaeg taimes on 1 μs (Karuppanapandian jt., 2011). Seega – on vajalik kohandada vesinikperoksiidi kontsentratsiooni sellisele tasemele, et selle abil saaks

matkida taime ROS-purset. Sobiva kontsentratsiooni leidmiseks on vaja teha täiendavaid katseid.

P. putida LapF ei pruugi olla ainult biofilmiga seotud valk, sest bakter moodustab (olenevalt söötimest) tugevat biofilmi ka juhul, kui vastav geen on deleteeritud (Lahesaare, 2011; Moor jt., 2014). LapF valgu olemasolu põhjustab bakteri rakkude hüdrofoobsuse muutust. Kuna raku hüdrofoobsus mõjutab ainete imendumist, võib valgu peamine ülesanne olla hoopis bakteri kaitsmine toksiliste ühendite eest, mis (bakterit või biofilmi) ümbritsevas keskkonnas leiduvad. Võimalik, et tänu rakkude hüdrofoobsusele paiknevad rakud biofilmis tihedamalt ja tõrjuvad nii toksilisi ühendeid efektiivsemalt, vastavalt ühendi hüdrofoobsusele (Lahesaare, 2011). LapF ülesande täpseks määratlemiseks on vaja teha veel katseid erineva hüdrofoobsusega taimemetaboliitidega ja nende analoogidega.

Hüdrofiilsuse ja LapF põhjustatud hüdrofoobsuse seos avaldus Na-salitsülaadi puhul. Rakud, milles on LapF olemas, kasvasid Na-salitsülaati sisaldavas keskkonnas paremini võrreldes hüdrofiilsemate, LapF-ita rakkudega. Samas, kõige hüdrofiilsem kasutatud ühenditest – katehool – mõjus rakkudele LapF-ist sõltumatult. Mõne aine puhul ei pruugi hüdrofoobsus olla ainus toksilisusega seotud näitaja.

Tulemustest saab järeldada, et kindlasti on vajalik korduskatse generatsioonide määramiseks – oksüdeerivate kemikaalide (vesinikperoksiid, *paraquat*) kontsentratsioonid olid liiga kõrged, et kasvuparameetreid määrata. Biofilmi biomassi katseks olid kontsentratsioonid sobivad (lisa 1, lisa 2, lisa 3, lisa 4). Mõned Na-salitsülaadi kontsentratsioonid tuli siiski välja jätta, kuna tegemist polnud biofilmiga, vaid kristallvioleti mittespetsiifilise kinnitumisega kannu põhja (lisa 1).

Tundub, et valk LapF mängib siiski rolli bakteri kaitsmisel toksiliste ühendite eest, näiteks Na-salitsülaadi puhul. Seega – võimalik, et LapF on roll taimejuurte koloniseerimisel, et bakter suudaks vastu pidada taime immuunsusega seotud kemikaalidele, eriti just pidevalt eritatavatele ühenditele, nagu seda on Na-salitsülaat.

Kokkuvõtvalt, uuritud kemikaalidest oli LapF oluline ainult Na-salitsülaati sisaldavas söötmes, teiste kemikaalide puhul LapF esinemisel või puudumisel polnud *P. putida* kasvule ega biofilmile tähtsust. Siiski, lõpliku järelduse tegemiseks on vajalik teha lisakatseid, mis kinnitaks LapF-i olulisust või ebaolulisust hüdrofiilsete toksiliste ainete eest kaitsmiseks. Kemikaalide mõju planktilistele rakkudele on vaja uurida madalamate kemikaali

kontsentratsioonide juures, näiteks generatsiooniaegade määramine polnud töös kasutatud kontsentratsioonide puhul võimalik.

Kokkuvõte

Meie laboris on eelnevad katsed näidanud, et *P. putida* LapF mõjutab raku hüdrofoobsust – pinnavalk muudab rakku hüdrofoobsemaks. Oma töös uurisin nelja erineva hüdrofoobsusega taimemetaboiidi ja LapF-i olemasolu koosmõju *P. putida* kasvule ja biofilmile.

Uuritud kemikaalidest oli LapF-ga selge koosmõju Na-salitsülaadiga – ühend on hüdrofiilne ja mõjub *lapF* deletandile tugevamalt, kui *P. putida* metsiktüvele. Biofilmi moodustamisele mõjub naatriumsalitsülaat soodustavalt – nii *P. putida* WT kui *lapF* deletant moodustasid kemikaali lisamisel biofilmi rohkem. WT tüve biofilmi biomass oli suurem võrreldes *lapF* deletandi biofilmiga.

Vesinikperoksiid ja *paraquat*, mõlemad oksüdatiivse stressi tekitajad, mõjusid *P. putida* kasvule ja biofilmi biomassile pärssivalt. Katehhool on uuritud ühenditest kõige hüdrofiilsem, see pärssib rakkude kasvu ja soodustab biofilmi teket. LapF pinnavalguga statistiliselt olulist koosmõju neil kolmel ühendil ei olnud.

Võimalik, et Na-salitsülaat ja katehhool mõjusid *P. putida* biofilmile soodustavalt, kuna need kemikaalid on taimes pidevalt olemas. Vesinikperoksiid ja selle pikaaegset oksüdeerivat mõju imiteeriv *paraquat* on seotud ROS-purskega taimes, mille abil tõrjutakse patogeene – seega inhibeerivad need kemikaalid ka bakterite biofilmi teket, et patogeen taime ei koloniseeriks.

Summary

As food demand keeps growing and crop yields around the world keep falling, new solutions to boost crop yields are vital to avoid a global famine. One possible solution is to use plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR). PGPRs attach to plant roots and boost crop yields by increasing nutrient availability, repelling pathogens and producing phytohormones that promote plant growth.

Pseudomonas putida is a PGPR with many uses beyond just promoting plant growth – for example, it can be used to improve soil quality, purify water and degrade phenolic compounds in industrial waste. In agricultural use, however, attachment to plant roots (and forming a biofilm) is essential.

LapF is a protein that influences cell surface hydrophobicity of *P. putida*. Additionally, it plays an important role in attachment and biofilm formation as well as maintenance. The focus of this work was to find a connection between plant metabolites (sodium salicylate, hydrogen peroxide, catechol and paraquat) and LapF. It was hypothesized that LapF promotes the growth and biofilm formation of *P. putida* when different plant metabolites are added to growth medium.

It was found that LapF promotes *P. putida* growth and biofilm formation in the presence of sodium salicylate. Hydrogen peroxide, paraquat and catechol influenced growth and biofilm formation independent of LapF.

Since sodium salicylate is a relatively hydrophilic compound, the connection with LapF makes sense – *lapF* expression increases cell hydrophobicity and thus resistance to hydrophilic compounds is also increased.

Tänuõnad

Soovin südamest tänada kõiki, kes on mind bakalaureuse läbimisel ja lõputöö tegemisel aidanud. Eriti tahan tänada oma juhendajat Riho Terast, kes aitas mind nii laboris katsete tegemisel kui töö kirjutamisel. Aitäh ka Marge Puhmale ja Karl Jürgensteinile, kes andsid mulle suurepäraseid näpunäiteid laboris töötamiseks. Lisaks tahan tänada Jasper Ristkoki ja Marge Nelki, kes olid moraalseks toeks ja igal teisel moel abiks. Suur aitäh kõigile!

Kasutatud kirjanduse loetelu

- Aeron, A., Khare, E., Jha, C. K., Meena, V. S., Aziz, S. M. A., Islam, M. T., Kim, K., Meena, S. K., Pattanayak, A., Rajashekara, H., Dubey, R. C., Maurya, B. R., Maheshwari, D. K., Saraf, M., Choudhary, M., Verma, R., Meena, H. N., Subbanna, A. R. N. S., Parihar, M., Meena, R. K. (2019). Revisiting the plant growth-promoting rhizobacteria: lessons from the past and objectives for the future. *Archives of Microbiology*, 202(4), 665–676.
<https://doi.org/10.1007/s00203-019-01779-w>
- Ahmad, P., Sarwat, M., & Sharma, S. (2008). Reactive oxygen species, antioxidants and signaling in plants. *Journal of Plant Biology*, 51(3), 167–173.
<https://doi.org/10.1007/BF03030694>
- Astover, A.; Kõlli, R.; Roostalu, H.; Reintam, E.; Leedu, E. (2012). *Mullateadus. Õpik kõrgkoolidele*. (1st ed.).
- Bais, H. P., Weir, T. L., Perry, L. G., Gilroy, S., & Vivanco, J. M. (2006). the Role of Root Exudates in Rhizosphere Interactions With Plants and Other Organisms. *Annual Review of Plant Biology*, 57(1), 233–266.
<https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105159>
- Bar-Ness, E., Chen, Y., Hadar, Y., Marschner, H., & Rmheld, V. (1991). Siderophores of *Pseudomonas putida* as an iron source for dicot and monocot plants. *Plant and Soil*, 130(1–2), 231–241. <https://doi.org/10.1007/BF00011878>
- Berlanga, M., & Guerrero, R. (2016). Living together in biofilms: The microbial cell factory and its biotechnological implications. *Microbial Cell Factories*, 15(1), 1–11.
<https://doi.org/10.1186/s12934-016-0569-5>
- Bernier, S. P., Ha, D.-G., Khan, W., Merritt, J. H., & O'Toole, G. A. (2011). Modulation of *Pseudomonas aeruginosa* surface-associated group behaviors by individual amino acids through c-di-GMP signaling. *Research in Microbiology*, 162(7), 680–688.
<https://doi.org/10.1016/j.resmic.2011.04.014>
- Bhal, S. (2007). Log P — Making Sense of the Value. *Advanced Chemistry Development*, 1–4. https://www.acdlabs.com/download/app/physchem/making_sense.pdf
- Bhattacharyya, P. N., & Jha, D. K. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Emergence in agriculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(4),

- 1327–1350. <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0979-9>
- Carter, P. B., Norin, E., & Swennes, A. G. (2020). *Gnotobiotics and the Microbiome*. *January*, 827–848. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128143384000210>
- Chowdhury, A., Pradhan, S., Saha, M., & Sanyal, N. (2008). Impact of pesticides on soil microbiological parameters and possible bioremediation strategies. *Indian Journal of Microbiology*, 48(1), 114–127. <https://doi.org/10.1007/s12088-008-0011-8>
- Dalgaard, P., & Koutsoumanis, K. (2001). Comparison of maximum specific growth rates and lag times estimated from absorbance and viable count data by different mathematical models. *Journal of Microbiological Methods*, 43(3), 183–196. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(00\)00219-0](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(00)00219-0)
- Danhorn, T., & Fuqua, C. (2007). Biofilm Formation by Plant-Associated Bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 61(1), 401–422. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.61.080706.093316>
- Desbrosses, G. J., & Stougaard, J. (2011). Root nodulation: A paradigm for how plant-microbe symbiosis influences host developmental pathways. *Cell Host and Microbe*, 10(4), 348–358. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2011.09.005>
- Droge, B., Doré, H., Borland, S., Wisniewski-Dyé, F., & Prigent-Combaret, C. (2012). Which specificity in cooperation between phytostimulating rhizobacteria and plants? *Research in Microbiology*, 163(8), 500–510. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2012.08.006>
- Egamberdieva, D., & Kucharova, Z. (2009). Selection for root colonising bacteria stimulating wheat growth in saline soils. *Biology and Fertility of Soils*, 45(6), 563–571. <https://doi.org/10.1007/s00374-009-0366-y>
- Fariduddin, Q., Hayat, S., & Ahmad, A. (2003). Salicylic Acid Influences Net Photosynthetic Rate, Carboxylation Efficiency, Nitrate Reductase Activity, and Seed Yield in Brassica juncea. *Photosynthetica*, 41(2), 281–284. <https://doi.org/10.1023/B:PHOT.0000011962.05991.6c>
- Guo, J. K., Muhammad, H., Lv, X., Wei, T., Ren, X. H., Jia, H. L., Atif, S., & Hua, L. (2020). Prospects and applications of plant growth promoting rhizobacteria to mitigate soil metal contamination: A review. *Chemosphere*, 246, 125823.

<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.125823>

- Hoyle, F. C., D'Antuono, M., Overheu, T., & Murphy, D. V. (2013). Capacity for increasing soil organic carbon stocks in dryland agricultural systems. *Soil Research*, 51(7–8), 657–667. <https://doi.org/10.1071/SR12373>
- Jakovleva, J., Teppo, A., Velts, A., Saumaa, S., Moor, H., Kivisaar, M., & Teras, R. (2012). Fis regulates the competitiveness of *Pseudomonas putida* on barley roots by inducing biofilm formation. *Microbiology*, 158(3), 708–720. <https://doi.org/10.1099/mic.0.053355-0>
- Jin, J., Wang, M., Lu, W., Zhang, L., Jiang, Q., Jin, Y., Lu, K., Sun, S., Cao, Q., Wang, Y., & Xiao, M. (2019). Effect of plants and their root exudate on bacterial activities during rhizobacterium–plant remediation of phenol from water. *Environment International*, 127(March), 114–124. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.03.015>
- Karuppanapandian, T., Moon, J. C., Kim, C., Manoharan, K., & Kim, W. (2011). Reactive oxygen species in plants: Their generation, signal transduction, and scavenging mechanisms. *Australian Journal of Crop Science*, 5(6), 709–725.
- Khan, M. R., & Siddiqui, Z. A. (2019). Potential of *Pseudomonas putida*, *Bacillus subtilis*, and their mixture on the management of *Meloidogyne incognita*, *Pectobacterium betavascularum*, and *Rhizoctonia solani* disease complex of beetroot (*Beta vulgaris* L.). *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 29(1), 73. <https://doi.org/10.1186/s41938-019-0174-0>
- Kivisaar, M. (2020). Narrative of a versatile and adept species *Pseudomonas putida*. *Journal of Medical Microbiology*, 69(3), 324–338. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.001137>
- Kopytko, M., Chalela, G., & Zauscher, F. (2002). Biodegradation of two commercial herbicides (Gramoxone and Matancha) by the bacteria *Pseudomonas putida*. *Electronic Journal of Biotechnology*, 5(2), 182–195. <https://doi.org/10.2225/vol5-issue2-fulltext-1>
- Kumar, A., Kumar, S., & Kumar, S. (2005). Biodegradation kinetics of phenol and catechol using *Pseudomonas putida* MTCC 1194. *Biochemical Engineering Journal*, 22(2), 151–159. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2004.09.006>
- Lahesaare, A. (2011). The role of global regulator Fis in regulating the expression of soil bacterium *Pseudomonas putida*. *Tartu: Tartu Ülikooli Kirjastus*, 126.

- Lahesaare, A., Ainelo, H., Teppo, A., Kivisaar, M., Heipieper, H. J., & Teras, R. (2016). LapF and its regulation by fis affect the cell surface hydrophobicity of *Pseudomonas putida*. *PLoS ONE*, *11*(11), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0166078>
- Lascano, R., Munoz, N., Robert, G., Rodriguez, M., Melchiorre, M., Trippi, V., & Quero, G. (2012). Paraquat: An Oxidative Stress Inducer. *Herbicides - Properties, Synthesis and Control of Weeds*, January. <https://doi.org/10.5772/32590>
- López-Sánchez, A., Leal-Morales, A., Jiménez-Díaz, L., Platero, A. I., Bardallo-Pérez, J., Díaz-Romero, A., Acemel, R. D., Illán, J. M., Jiménez-López, J., & Govantes, F. (2016). Biofilm formation-defective mutants in *Pseudomonas putida*. *FEMS Microbiology Letters*, *363*(13). <https://doi.org/10.1093/femsle/fnw127>
- Martínez-Gil, M., Yousef-Coronado, F., & Espinosa-Urgel, M. (2010). LapF, the second largest *Pseudomonas putida* protein, contributes to plant root colonization and determines biofilm architecture. *Molecular Microbiology*, *77*(3), 549–561. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07249.x>
- Mikkelsen, H., Duck, Z., Lilley, K. S., & Welch, M. (2007). Interrelationships between Colonies, Biofilms, and Planktonic Cells of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, *189*(6), 2411–2416. <https://doi.org/10.1128/JB.01687-06>
- Moor, H. (2013). *Pseudomonas putida* globaalse regulaatori Fis osalus biofilmi moodustamises. *Tartu Ülikool, Magistritöö*.
- Moor, H., Teppo, A., Lahesaare, A., Kivisaar, M., & Teras, R. (2014). Fis overexpression enhances *Pseudomonas putida* biofilm formation by regulating the ratio of LapA and LapF. *Microbiology (United Kingdom)*, *160*, 2681–2693. <https://doi.org/10.1099/mic.0.082503-0>
- Morgan, J. A. W., Bending, G. D., & White, P. J. (2005). Biological costs and benefits to plant-microbe interactions in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*, *56*(417), 1729–1739. <https://doi.org/10.1093/jxb/eri205>
- Naseem, H., Ahsan, M., Shahid, M. A., & Khan, N. (2018). Exopolysaccharides producing rhizobacteria and their role in plant growth and drought tolerance. *Journal of Basic Microbiology*, *58*(12), 1009–1022. <https://doi.org/10.1002/jobm.201800309>
- Pathak, R., Shrestha, A., Lamichhane, J., & Gauchan, D. P. (2017). PGPR in biocontrol:

- mechanisms and roles in disease suppression. *Int. J. Agron. Agri. R.*, 11(1), 69–80.
<http://www.innspub.net/wp-content/uploads/2017/08/IJAAR-Vol-11-No-1-p-69-80.pdf>
- Plyuta, V. A., Lipasova, V. A., Kuznetsov, A. E., & Khmel, I. A. (2013). Effect of salicylic, indole-3-acetic, gibberellic, and abscisic acids on biofilm formation by *Agrobacterium tumefaciens* C58 and *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 49(8), 706–710. <https://doi.org/10.1134/S000368381308005X>
- Plyuta, V., Zaitseva, J., Lobakova, E., Zagorskina, N., Kuznetsov, A., & Khmel, I. (2013). Effect of plant phenolic compounds on biofilm formation by *pseudomonas aeruginosa*. *Apmis*, 121(11), 1073–1081. <https://doi.org/10.1111/apm.12083>
- Prithiviraj, B., Bais, H. P., Weir, T., Suresh, B., Najjarro, E. H., Dayakar, B. V., Schweizer, H. P., & Vivanco, J. M. (2005). Down Regulation of Virulence Factors of. *Society*, 73(9), 5319–5328. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.9.5319>
- Puhm, M. (2018). Söötmeekomponentide mõju *Pseudomonas putida* biofilmile. *Tartu Ülikool, Bakalaureusetöö*.
- Ray, D. K., Mueller, N. D., West, P. C., & Foley, J. A. (2013). Yield Trends Are Insufficient to Double Global Crop Production by 2050. *PLoS ONE*, 8(6).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066428>
- Ren, H., Huang, B., Fernández-García, V., Miesel, J., Yan, L., & Lv, C. (2020). Biochar and rhizobacteria amendments improve several soil properties and bacterial diversity. *Microorganisms*, 8(4), 1–17. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8040502>
- Rivas-San Vicente, M., & Plasencia, J. (2011). Salicylic acid beyond defence: Its role in plant growth and development. *Journal of Experimental Botany*, 62(10), 3321–3338.
<https://doi.org/10.1093/jxb/err031>
- Rizvi, S., Pagnutti, C., Fraser, E., Bauch, C. T., & Anand, M. (2018). Global land use implications of dietary trends. *PLoS ONE*, 13(8), 1–12.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200781>
- Rudrappa, T., Quinn, W. J., Stanley-Wall, N. R., & Bais, H. P. (2007). A degradation product of the salicylic acid pathway triggers oxidative stress resulting in down-regulation of *Bacillus subtilis* biofilm formation on *Arabidopsis thaliana* roots. *Planta*, 226(2), 283–297. <https://doi.org/10.1007/s00425-007-0480-8>

- Schiferl, L. D., & Heald, C. L. (2018). Particulate matter air pollution may offset ozone damage to global crop production. *Atmospheric Chemistry and Physics*, 18(8), 5953–5966. <https://doi.org/10.5194/acp-18-5953-2018>
- Sheoran, N., Kumar, A., Munjal, V., Nadakkakath, A. V., & Eapen, S. J. (2016). *Pseudomonas putida* BP25 alters root phenotype and triggers salicylic acid signaling as a feedback loop in regulating endophytic colonization in *Arabidopsis thaliana*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 93, 99–111. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2016.01.008>
- Spoering, A. L., & Lewis, K. (2001). Biofilms and Planktonic Cells of *Pseudomonas aeruginosa* Have Similar Resistance to Killing by Antimicrobials. *Journal of Bacteriology*, 183(23), 6746–6751. <https://doi.org/10.1128/JB.183.23.6746-6751.2001>
- Stanley, N. R., & Lazazzera, B. A. (2004). Environmental signals and regulatory pathways that influence biofilm formation. *Molecular Microbiology*, 52(4), 917–924. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04036.x>
- Stewart, P. S. (2003). Diffusion in Biofilms. *Journal of Bacteriology*, 185(5), 1485–1491. <https://doi.org/10.1128/JB.185.5.1485-1491.2003>
- Torres, M. A., Jones, J. D. G., & Dangel, J. L. (2006). Reactive oxygen species signaling in response to pathogens. *Plant Physiology*, 141(2), 373–378. <https://doi.org/10.1104/pp.106.079467>
- Vacheron, J., Desbrosses, G., Bouffaud, M. L., Touraine, B., Moënné-Loccoz, Y., Muller, D., Legendre, L., Wisniewski-Dyé, F., & Prigent-Combaret, C. (2013). Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. *Frontiers in Plant Science*, 4(SEP), 1–19. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00356>
- Vives-Peris, V., de Ollas, C., Gómez-Cadenas, A., & Pérez-Clemente, R. M. (2020). Root exudates: from plant to rhizosphere and beyond. *Plant Cell Reports*, 39(1), 3–17. <https://doi.org/10.1007/s00299-019-02447-5>
- Vives-Peris, V., Gómez-Cadenas, A., & Pérez-Clemente, R. M. (2018). Salt stress alleviation in citrus plants by plant growth-promoting rhizobacteria *Pseudomonas putida* and *Novosphingobium* sp. *Plant Cell Reports*, 37(11), 1557–1569. <https://doi.org/10.1007/s00299-018-2328-z>

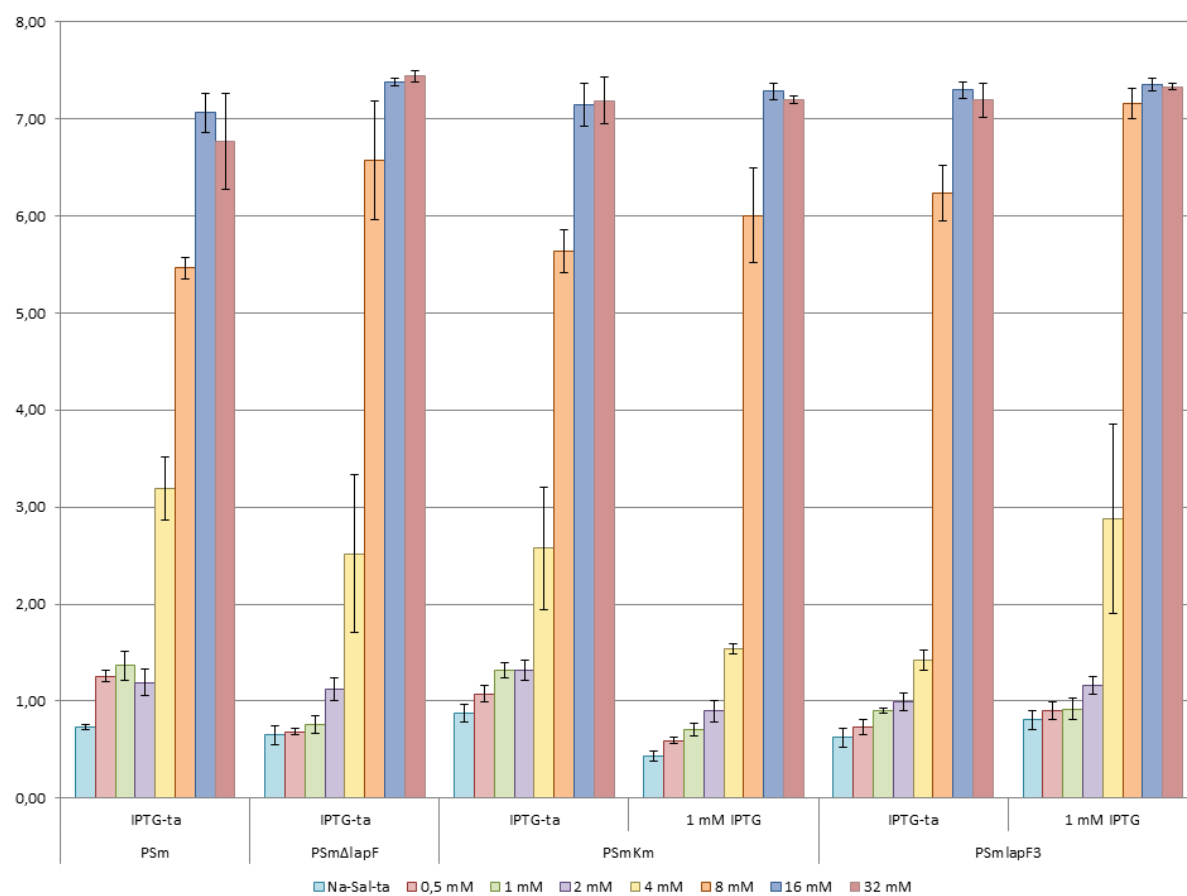
- Walker, T. S., Bais, H. P., Grotewold, E., & Vivanco, J. M. (2003). *Update on Root Exudation and Rhizosphere Biology Root Exudation and Rhizosphere Biology 1*. 132(May), 44–51. <https://doi.org/10.1104/pp.102.019661>. Although
- Yan, S., & Dong, X. (2014). Perception of the plant immune signal salicylic acid. *Current Opinion in Plant Biology*, 20, 64–68. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2014.04.006>
- Zheng, Y., Li, Y., Long, H., Zhao, X., Jia, K., Li, J., Wang, L., Wang, R., Lu, X., & Zhang, D. (2018). *bifA* regulates biofilm development of *Pseudomonas putida* MnB1 as a primary response to H₂O₂ and Mn²⁺. *Frontiers in Microbiology*, 9(JUL), 1–20. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01490>
- Zulfikar Ali, S., Sandhya, V., Grover, M., Linga, V. R., & Bandi, V. (2011). Effect of inoculation with a thermotolerant plant growth promoting *Pseudomonas putida* strain AKMP7 on growth of wheat (*Triticum* spp.) under heat stress. *Journal of Plant Interactions*, 6(4), 239–246. <https://doi.org/10.1080/17429145.2010.545147>

Kasutatud veebiaadressid

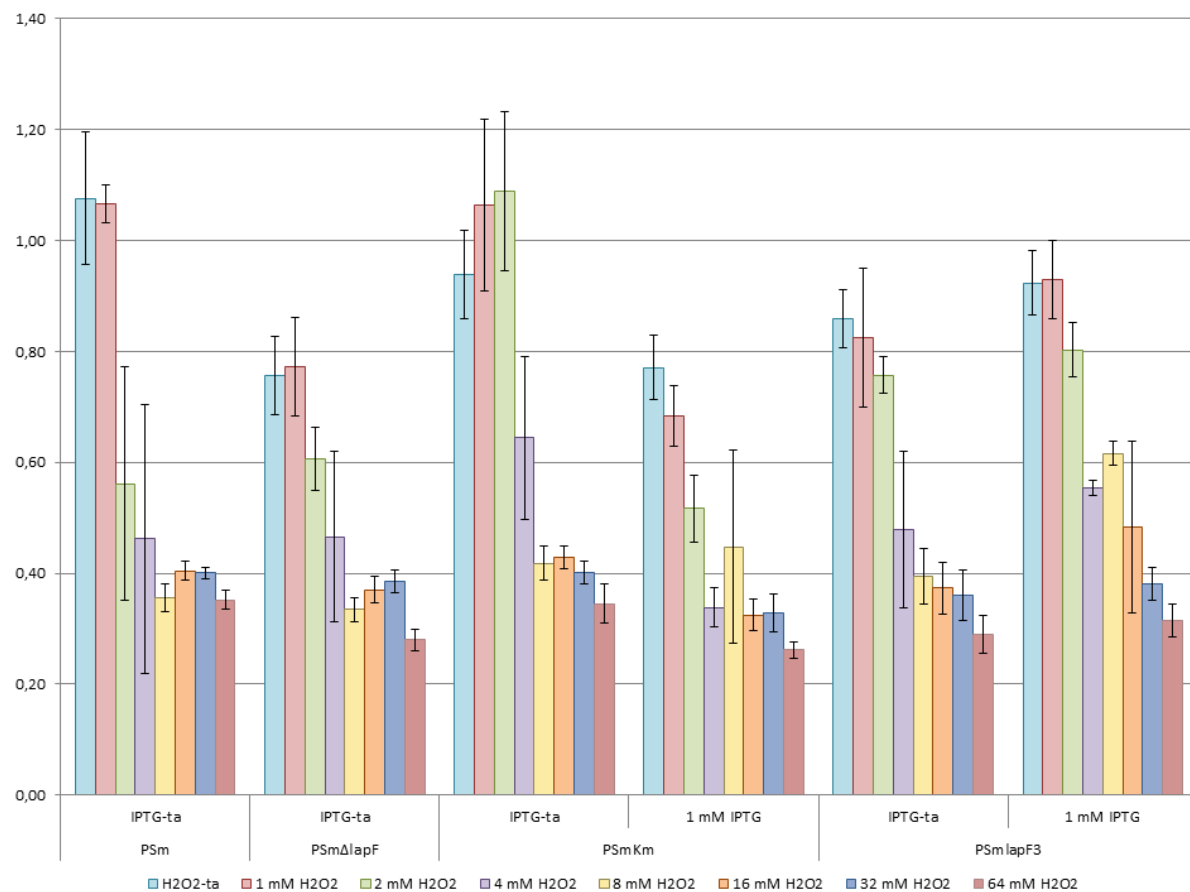
National Center for Biotechnology Information, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>
(kasutatud: 10.04.2020)

Lisad

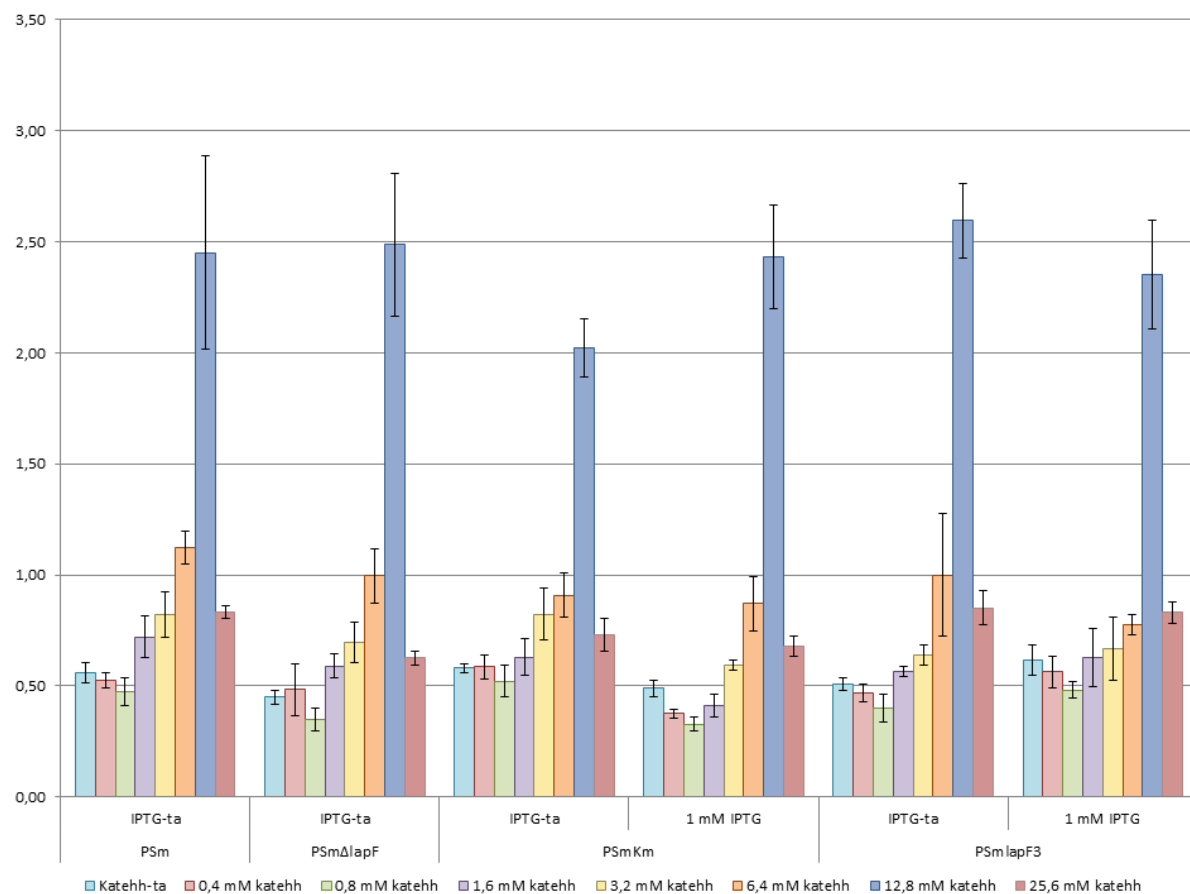
Lisa 1. Na-Sal biofilmid. Neelduvuste (A_{540}) keskmised.



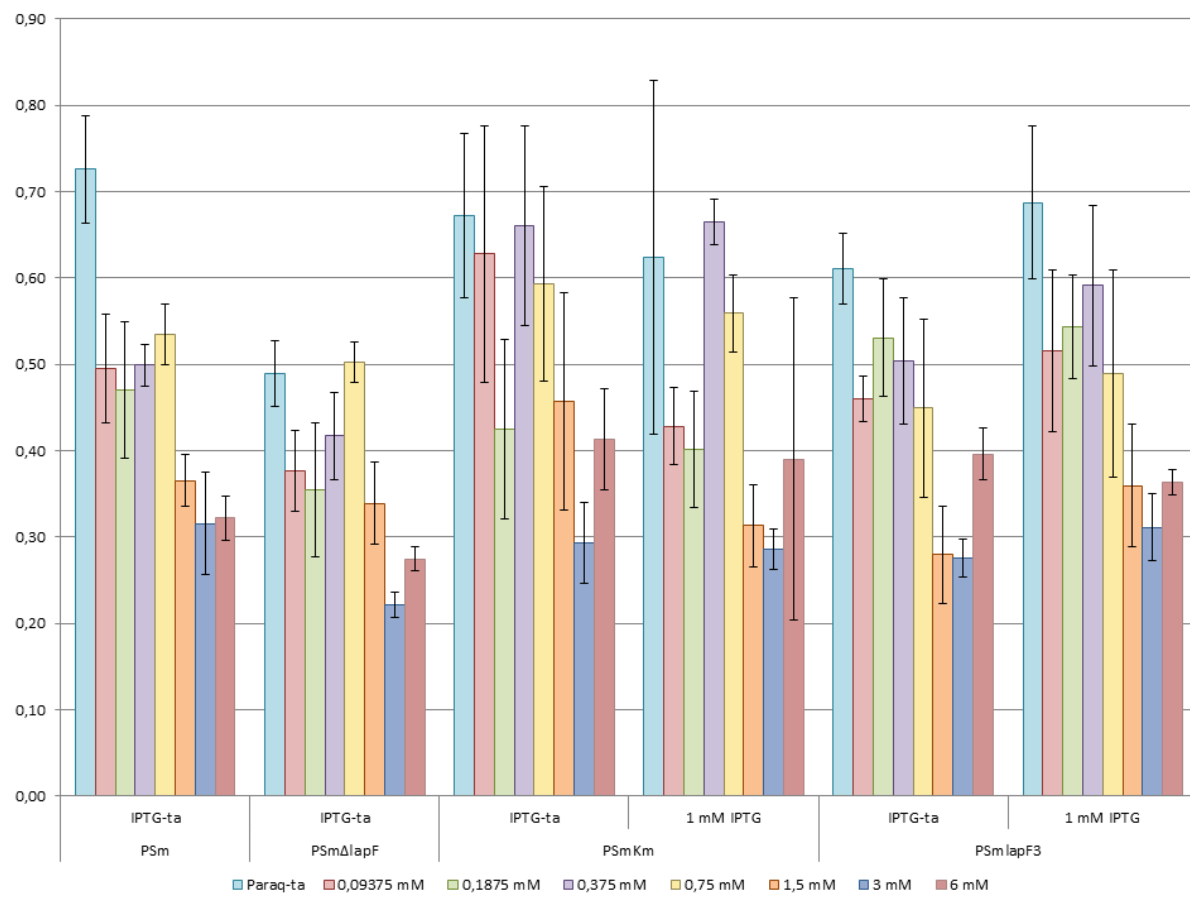
Lisa 2. H₂O₂ biofilmid. Neelduvuste (A₅₄₀) keskmised.



Lisa 3. Katehhooli biofilmid. Neelduvuste (A_{540}) keskmised.



Lisa 4. *Paraquat*'i biofilmid. Neelduvuste (A_{540}) keskmised.



Lihtlitsents

Mina, Mia-Nicolena Aaver (07.11.1997)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose „LapF-i ja taimemetaboliitide mõju *Pseudomonas putida* biofilmile ja kasvule“, mille juhendaja on Riho Teras
 - 1.1. reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
 - 1.2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 3.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
2. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Mia-Nicolena Aaver
Tartus, 03.06.2020